

Title	ゴミコナダニ属コナダニの性フェロモン( Dissertation_全文 )
Author(s)	森, 直樹
Citation	Kyoto University (京都大学)
Issue Date	1996-05-23
URL	<a href="http://dx.doi.org/10.11501/3112234">http://dx.doi.org/10.11501/3112234</a>
Right	
Type	Thesis or Dissertation
Textversion	author

新 制
農
726
京大附図

# ゴミコナダニ属コナダニの性フェロモン

森 直樹

1996

# ゴミコナダニ属コナダニの性フェロモン

森 直樹

1996

# 目 次

第1章	序 論	1
第2章	配偶行動	
2-1	緒言	8
2-2	結果	9
2-2-1	<i>C. rodriguezi</i> の配偶行動	9
2-2-2	その他の <i>Caloglyphu</i> spp. の配偶行動	18
2-3	考察	18
2-4	実験の部	20
第3章	ゴミコナダニ属ダニ雌の性フェロモンの同定	
3-1	緒言	23
3-2	<i>Caloglyphus</i> sp. 1 の雌の性フェロモン	24
3-2-1	雌の性フェロモンの単離と構造決定	24
3-2-2	合成 epoxyneral を用いたフェロモン活性	31
3-2-3	雌の性フェロモンの分布様式	32
3-2-4	考察	34
3-2-5	実験の部	36
3-3	<i>Caloglyphus rodriguezi</i> の雌の性フェロモン	43
3-3-1	雌雄の識別	43
3-3-2	雌の性フェロモンの構造決定と生物活性	44
3-3-3	雌の性フェロモンの分布様式	50
3-3-4	考察	52
3-3-5	実験の部	55
3-4	<i>Caloglyphus</i> sp. 2 の雌の性フェロモン	59
3-4-1	雌の性フェロモンの構造決定と生物活性	59

3-4-2	Rosefuran の合成と生物活性	63
3-4-3	雌の性フェロモンの分布様式	66
3-4-4	考察	67
3-4-5	実験の部	68
3-5	<i>Caloglyphu polyphyllae</i> の雌の性フェロモン	72
3-5-1	緒言	72
3-5-2	雌の性フェロモンの分布様式	72
3-5-3	実験の部	74
3-6	まとめ	76
第4章	雄ダニによる雌雄の識別について	
4-1	緒言	78
4-2	ゴミコナダニ属ダニ4種の雄による雌雄の識別	78
4-3	考察	82
4-4	実験の部	84
第5章	総合考察	86
摘要		98
謝辞		100
引用文献		101

## 第1章 序論

食物連鎖に象徴されるように、自然界で生物は複雑に関連し合っており、一つの生態系を構成している。個々の生物間にも多種多様な相互作用が機能しており、聴覚や視覚に加え、化学物質を介した嗅覚も大きく活用されていることが判ってきた。この生物間相互作用に関わる化学物質の機能と化学構造の研究は、近年昆虫を中心に詳細に行われ、膨大な知見が蓄積されてきた。特に、昆虫の性フェロモンでは部分的にその実用化が始まっている。性フェロモン以外にも、同種個体間で作用する化学物質として、警報フェロモンや集合フェロモン等のフェロモン類や他種生物間で作用するアレロケミカル類など、様々な機能の化合物が現在同定されている。

ところが、昆虫と同じ節足動物門であり、昆虫に次ぐ多様化に成功し、地球上のあらゆる環境に適応したとされるダニは、人類の身近にしながら、体が微小で認識しにくいいためか、その存在は意外に知られていない。一般的には嫌われもののダニであるが、その大部分は人類の生存には無関係な存在であり、以下に述べる一部のダニのみが問題種である。風土病として古くから知られているツツガムシ病はツツガムシ類が、病院などで集団発生する疥癬はヒゼンダニ類が、最近わが国でも患者が見つかったライム病は吸血性のマダニ類が媒介し、近年大発生しているアトピー性皮膚炎にはヒョウヒダニ類の関与が示唆されている。また、ハダニ類やネダニ類は農業害虫として、コナダニ類は食品衛生害虫として知られている。しかし、昆虫と異なり、それらの生物間相互作用物質に関する知見は僅かで、その研究は始まったばかりである。現在判っているこれらダニの化学生態学的研究を次に纏める。

後気門亜目マダニ科には、上述したように吸血性でライム病を媒介する種の他に、ピロプラズマ症を引き起こす畜産業の害虫種なども知られており、人類と関わり合いを持つ種が多い。その為、フェロモンに関する多くの研究がなされ、配偶行動の各ステップに関与する様々なフェロモンが同定されている (Sonenshine et al., 1991)。先ず、吸血雌が誘引性の性フェロモンであ

る 2, 6-dichlorophenol を分泌して、雄を誘引することがキラマダニ属 *Amblyomma americanum* で初めて同定された (Berger, 1972) . その後マダニ科 5 属 14 種 (Hamilton et al., 1989) で 2, 6-dichlorophenol の存在が確認され、非種特異的なフェロモンと考えられている (Sonenshine, 1985) . 続いて誘引された雄は雌の背中に登り、雌の背中を丹念に調べながら後胴体部へ移行する。この過程で雄が相手を同種の雌と認識する。体表に存在するマウント性の性フェロモンの感知によって、この同種雌の認識が行われていると考えられている。実際に、カクマダニ属 *Dermacentor variabilis* からマウント性の性フェロモンとして cholesteryl oleate が同定されている (Hamilton et al., 1989) . しかし、*D. variabilis* と同属の *D. andersoni* では、生殖腺から分泌される 20-OH ecdyson (Sonenshine et al., 1985) と  $C_{14} \sim C_{18}$  の飽和脂肪酸 (Allan et al., 1989) などが同種認識に更に必要という。これらは生殖腺の性フェロモンと考えられている。一方その他にも、宿主に移る前の若虫に存在し集合を維持するために働く集合フェロモン assembly pheromone (Gerge, 1981) や宿主上で特定の部分に集まるために雄が分泌する集合フェロモンの存在も知られている (Hajokova and Leahy, 1982) .

前気門亜目ハダニ科にも、性フェロモンの存在が知られている。雄のナミハダニ *Tetranychus urticae* は、成虫脱皮直前の静止期第二若虫の雌を“交尾前ガード”する (Potter and Wrensch, 1978) . 雄は雌胴体部に第一脚と触肢を接触させてガードし、吐糸して雌を覆ったり、他の雄が近づくとこれを攻撃する。ガードしながら雄は若虫雌の成虫脱皮を待ち、脱皮が完了するとすぐに交尾する。この交尾前のガード行動には、雌性フェロモンの関与が示唆され、活性物質として farnesol, nerolidol, geraniol 及び citronellol が同定されている (Regev and Cone, 1975, 1976 and 1980) . しかし、これらの性フェロモンだけでは活性が認められないとの報告もある (Royalty et al., 1992) . その後、詳細な生物試験により、性フェロモンの他に雌ダニの黄色色素や形の要素などもガード行動の解発に関与すると結論された (Royalty et al., 1993) .

無気門亜目コナダニ科の代表的な種であるケナガコナダニ *Tyrophagus putrescentiae* に警報フェロモンの存在が確認され、活性化合物として蟻酸ネリルが同定された (Kuwahara et al., 1975) . このフェロモンは胴体部の後方に開口する一対の後胴体部腺 opisthonotal gland と呼ばれる分泌腺から分泌発散される (Kuwahara et al., 1980) . 後胴体部腺は無気門亜目のダニ類に普遍的に見つかる分泌腺であり、その成分が8科19種について系統的に研究された。その結果、7科11種に警報フェロモン、2種に集合フェロモン、また3種に性フェロモンが同定されている (桑原保正, 1990) . その他にも、抗菌性物質や種々の新規化合物が単離・同定され、無気門亜目ダニ類の分泌物が天然物有機化学的にも興味深い研究対象であると判ってきた。

中気門亜目ハエダニ科の一種 *Machrocheles muscaedomesticae* にも、ナミハダニと同様に“交尾前ガード”をする現象が認められている。雌第二若虫のエーテル可溶成分によりこの現象が解発されるが、現在のところ化学成分の同定には至っていない (Yasui, 1992) .

一方、前述のナミハダニと宿主植物及びナミハダニの天敵であるカブリダニ *Amblyseius potentillae* との3種間で機能する情報化学物質の存在が判ってきた (Dick et al., 1990) . ナミハダニに加害されたリママメが特有の匂い物質を放出して、ハダニの天敵であるカブリダニを誘引するというものである。この匂い物質は機械的にリママメを傷つけても検出されず、ハダニの加害により初めて誘導生産されるという。その他にも、ハイイロゴキブリ *Nauphoetha cinerea* の寄生ダニ *Proctolaelaps nauphoetae* ではハイイロゴキブリに特異的な物質を寄主認識物質として利用しているという (Egan, 1976) .

以上述べてきたように、ダニを材料として生物間相互作用物質の様々な研究が行われている。著者は今回コナダニ科の性フェロモンに着目した。上に述べたように、現在コナダニ科ではゴミコナダニ属の一種 *Caloglyphus polyphyllae* (Leal et al., 1989) , ムギコナダニ *Aleuroglyphus ovatus*



(Kuwahara et al., 1992) およびオソアシブトコナダニ *Acarus immobilis* (Sato et al., 1993) の3種で、雄のマウント行動を解発するフェロモン（雌の性フェロモン）が同定されている。しかし、これら雌の性フェロモンはいずれの場合も、雌だけではなく雄にも、時には若虫にも検出された。雄がマウントを試みる時、相手を雌と的確に識別しているのかどうか、興味深い問題が未解決で残されている。

そこで、本研究ではコナダニ科ゴミコナダニ属 (*Caloglyphus* spp.) の3種のダニ、*Caloglyphus* sp. 1, *C. rodriguezi* 及び *Caloglyphus* sp. 2と、これに雌の性フェロモンが判っている *C. polyphyllae* を加え、ゴミコナダニ属 (*Caloglyphus* spp.) 4種の配偶行動のシーケンスを詳細に観察した（第2章）。続いて上記3種のヘキササン抽出物から、それぞれの雌の性フェロモンを単離・構造決定し、合成によって同定すると共に、雌の性フェロモンが配偶行動のどのシーケンスに関与するかを調べた（第3章）。更に、フェロモン既知の *C. polyphyllae* を加えた4種で、雌の性フェロモン含量を雌・雄及び第一若虫で定量し、その分布様式（第3章）と雄による雌雄識別の有無について検討した（第4章）。図1-1に本研究で新たに同定したゴミコナダニ属3種の雌の性フェロモンを含む、3属6種におけるコナダニ科ダニの雌の性フェロモンを挙げる。また、本研究で用いたゴミコナダニ属4種の写真を図1-2に示す。

# Female sex pheromones obtained from Astigmatid mites

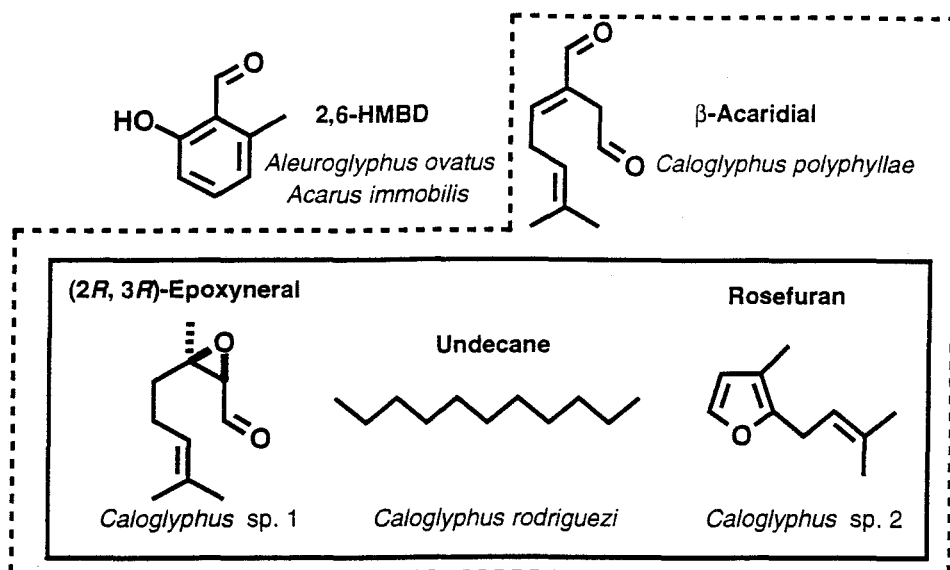


図1-1 現在までに同定されたコナダニ科の雌の性フェロモン



図1-2 本研究で用いた4種のゴミコナダニ属ダニ (1)

上 : *Caloglyphus* sp. 1

下 : *Caloglyphus polyphyllae*



図1-2 本研究で用いた4種のゴミコナダニ属ダニ (2)

上 : *Caloglyphus rodriguezi*

下 : *Caloglyphus* sp. 2

## 第2章 配偶行動

### 2-1 緒言

コナダニ科コナダニ亜科に属するアシブトコナダニ *Acarus siro* の配偶行動は、よく研究されており (Boczek and Griffiths, 1979; Levinson et al., 1989), その行動は以下の4段階に分けられている。ステップ1: 成熟した雌が雄に近づき、数回雄の周りを回る。ステップ2: 雌の後胴体部に雄の顎体部が近づいたとき、雄は興奮して雌の側面からマウントする。ステップ3: 雄はマウントした後、雌の背面に同一方向を向いて約1分間静止する。一方、雌は雄を乗せたまま歩き回る。ステップ4: 雄は体を180度回転させ、雌の胴体部の上で後向きに乗り出して肛門吸盤と足根部吸盤で体を固定する。雄と雌はこの体勢を128～219分間維持し続け、この間に精子の授受が行われる。以上の配偶行動の観察と、ダニのアセトン抽出物を用いた生物試験から、ステップ1は雄が生産し雌を誘引する雄の性フェロモンによって解発され、ステップ2と3は雌が生産し雄に性行動を引き起こす雌の性フェロモンによって解発されると結論されている (Levinson et al., 1989)。現在のところ、それらの2種類のフェロモンの化学構造は明らかにされていない。

一方、コナダニ科のダニ3種で性フェロモンが同定されている。その研究の概要を述べよう。上述のアシブトコナダニに近縁のオソアシブトコナダニ *Acarus immobilis* で、雌の性フェロモンは2-hydroxy-6-methylbenzaldehyde と同定された。これは隔離した雄群にサンプルを挿入した際に、マウント行動を示す雄の割合を定性的に評価する生物試験法により同定された (Sato et al., 1993)。しかし、この化合物は雄自身にも存在する。更に、雌に誘引性の活性を示す雄の性フェロモンが、雌雄共通の炭化水素群と雄特有の炭化水素群の混合物であると同定されている (Sato et al., 1993)。コナダニ科コナダニ亜科のムギコナダニ *Aleuroglyphus ovatus* では、オソアシブトコナダニと同様にマウント行動を示す雄の割合を定性的に評価して、雌性フェロモン



として 2-hydroxy-6-methylbenzaldehyde が同定されている (Kuwahara et al., 1992) . この化合物も雄自身に存在するが、この種では雌ダニを顕著に誘引する雄の性フェロモンは認められていない. 同様に、コナダニ科ネダニ亜科ゴミコナダニ属の *Caloglyphus polyphyllae* で、ヘキササン抽出物から雌の性フェロモン活性を示す新規化合物として、2(*E*)-(4-methyl-3-pentenylidene)-butanedial ( $\beta$ -acaridial) が同定されている (Leal et al., 1989a) .  $\beta$ -Acaridial を染み込ませた濾紙片を雄ダニに与えると、雄は濾紙片に接近し、濾紙片周辺で雄同士がマウント行動を始める. しかし、*C. polyphyllae* 雌はダニのヘキササン抽出物に対して何の反応も示さない. 従って、この種でも雄の性フェロモンの存在は確認されていない. なお、前述のように性フェロモンの判明したこれら3種のダニで、配偶行動を行動学的に調べた詳細な報告はない.

そこで、ゴミコナダニ属ダニ (*Caloglyphus* spp.) の性フェロモンを調べるに当たって、先ずゴミコナダニ属ダニの配偶行動のシーケンスを明確にすることにした. 一方、同属の *C. anomalus* (Woodring, 1969; Pillai and Winston, 1969) や *C. berlesei* (Eraky, 1987; Radwin, 1991) の雌では何度も交尾する、いわゆる多回交尾の現象が認められており、その配偶行動に関する若干の報告はある. しかし、その交尾に至るシーケンスに言及したものはない. なお、*C. berlesei* では精子競争の観点から研究され、最後に交尾した雄が最も多く雌の卵を受精することが出来るという興味深い結果が報告されている (Radwin, 1991) .

## 2-2 結果

### 2-2-1 *C. rodriguezi* の配偶行動

予備実験として配偶行動を50例観察した. その結果、*C. rodriguezi* の配偶行動のシーケンスは (I) 接近行動、(II) マウント行動、(III) 執着行動、(IV) 交尾姿勢成立の4段階に分類した. 詳細に述べると、(I) で雄と雌が接近する. (II) で雄が両側の第1脚で雌の体に触れた後、マウン

トする。この時、雄は両方の第1脚で雌の体表を交互にトントンと叩くように触る“タッピング行動”を示した。この第1脚の上げ方は通常よりも高く、マウント行動に特徴的と思われた。(Ⅲ)は更に2段階に分けた。すなわち、(Ⅲ-1)マウントした雄は雌の背面で歩き回る。(Ⅲ-2)雄は雌の後胴体部及び腹壁に執着する。(Ⅳ)で雄は雌の胴体部の上に後ろ向きで体を固定し、交尾姿勢を成立させる。これらのうち、特に(Ⅱ)のマウント行動で雄ダニが示した特徴的な“タッピング行動”に注目した。

予備実験の結果を踏まえて、*C. rodriguezi*の配偶行動のパターンを図2-1-1のように分類した。そして、(Ⅰ)では雌雄の接近に雌雄どちらが積極的か、そして、その接近に方向性はあるのかが、また(Ⅲ)では雄のマウントにおける方向性の有無に注目し、*C. rodriguezi*の配偶行動120例を観察・整理した。

先ず、(Ⅰ)において、雌雄の接近に雌と雄のどちらが積極的となるかについて検討した。雄を予め入れた容器に雌を入れる(雄条件付け雌導入)場合と、雌を予め入れた容器に雄を入れる(雌条件付け雄導入)場合で、それぞれ検討した。結果を表2-1-1に示す。図2-1-1の分類では、雌雄が接近する段階は、(1a)雄が雌の側面から接近する、(1b)雄が雌の後方から接近する、(1c)雄と雌が正面から接近する、(1d)雌が雄の側面から接近する、(1e)雌が雄の後ろから接近する、の5通りに分類したが、表2-1-1では、雄から雌及び雌から雄に接近した頻度は(横側+後ろ側)で示した。

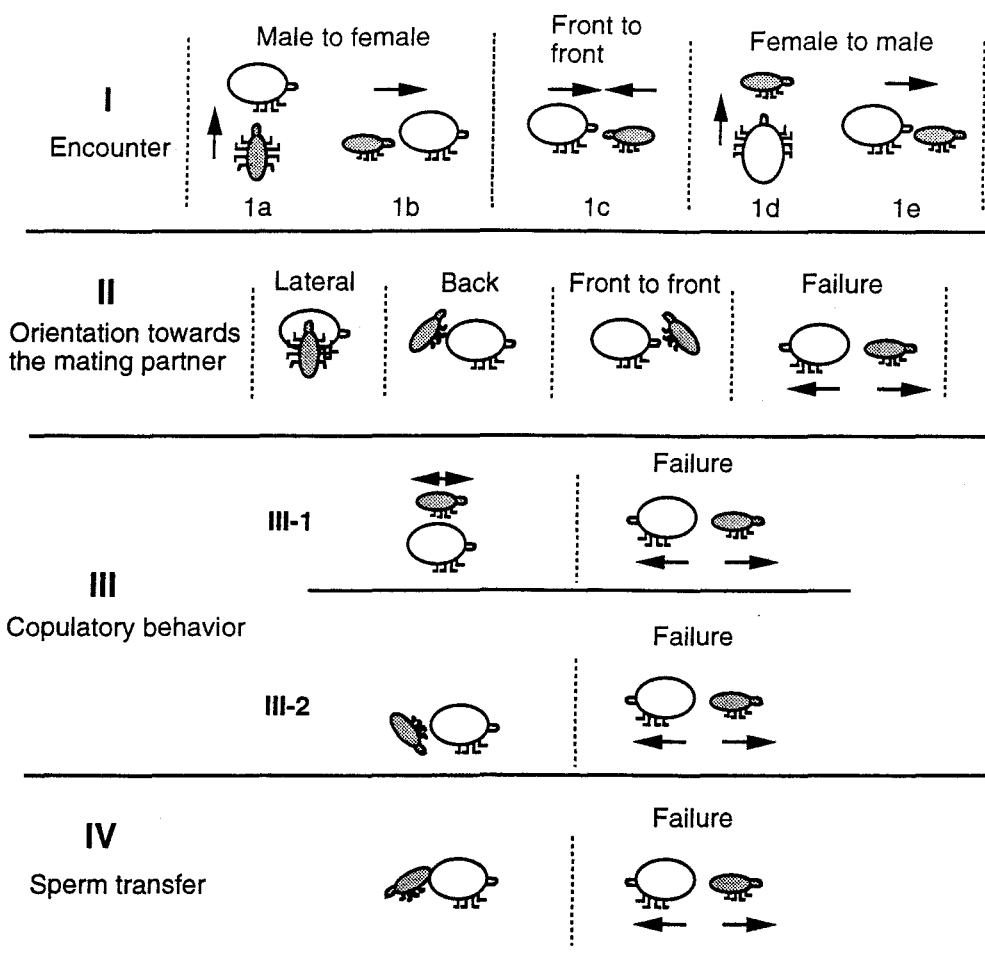


図 2 - 1 - 1 *C. rodriguezi* の配偶行動の分類



表 2-1-1 *C. rodriguezi* における雌雄の接近の仕方と交尾成功率  
(A) Introduce a female to a conditioned male

Encounter	Number of encounter (n=60)	Success	Success ratio (%)
Male to female	55	46	76.7
Front to front	5	3	5.0
Female to male	0	0	0
<hr/>			
Failure	0	-	-

(B) Introduce a male to a conditioned female

Encounter	Number of encounter (n=60)	Success	Success ratio (%)
Male to female	36	24	40.0
Front to front	8	4	6.7
Female to male	8	2	3.3
<hr/>			
Failure	8	-	-

表 2-1-1 の結果を以下に纏める。雄条件付け雌導入系では雌雄間の接触事例の 90% 以上が雄から雌によるもので、観察時間内に雌雄の接触に至らなかった事例は無かった。また、雄から雌への接触で始まる場合に高い割合で交尾姿勢が成立した。一方、雌条件付け雄導入系では雄から雌への接触は 60% に減ったが、それでも最も頻度は高く交尾姿勢成立に至る割合も高かった。雄条件付け雌導入系と雌条件付け雄導入系で、雄から雌への接触の割合が 90% 以上から 60% に減り、観察時間内で雌雄間の接触に至らない事例が 8 例に増えたのは、ストックカルチャーからミニシャーレにダニを移す影響が、雌より雄の方に大きくでたものと考えた。これは、移動の影響を少なからず受けた雄は、ミニシャーレ中で交尾相手を捜すよりも新しい環境を動き回るのに対して、本来動きが遅い雌は、移動された影響は受けるものの、ゆっくりミニシャーレ中を歩き回っている間に条件付けされた雄にマウントされたと解釈できる。また、配偶行動の観察事例の中には、*C. rodriguezi* の

雄が雌のすぐ横にいるにも関わらず、なかなか接触しない場合もあったが、雄が雌を追って2 mm 以上（雄体長の約2倍にあたる）進む事例が観察される場合もあった。挿入の際の移動の影響が雄に顕著に出ることや上述の観察事例から、配偶行動の初期段階で雌が雄に接近すると観察されているアシプトコナダニ（Bozek and Griffiths, 1979; Levinson et al., 1989）とは違い、ゴミコナダニ属ダニでは雄が積極的に雌に働きかけると結論した。

続いて、雄雌の接近の方向と雄が雌にマウントする方向に着目した。雌雄が接近・接触した後、雄はタッピング行動を示しながら雌にマウントする。この時、接近とマウントに方向性はあるのだろうか。得られた結果を表2-1-2に示す。この表では最初の接触を、雄から雌への接触・正面での接触・雌から雄への接触の三つの場合に分けた。更に、雄から雌への接触、雌から雄への接触の場合には接触が行われた方向を横と後ろに区別し、引き続き起こる雄の雌へのマウントがどの方向から起こるのかをまとめた。配偶行動を観察すると、雄に触れられた雌が動かない場合、雄はそのままマウントする。しかし、雄が雌にマウントする時、雌が逃げるような行動を示す場合も観察された。多くの場合は雄は雌を追いかけてマウントするが、そのまま雌に逃げられてしまう場合もある。

表2-1-2 *C. rodriguezi* 雄のマウントにおける方向性

Encounter mode of first touch	Number of encounter	Direction of mounting (number)				
		Lateral	Back	Front	to front	Failure
Male to female	Lateral 45 :	40	3	0		2
	Back 46 :	2	41	0		3
Front to front	13 :	5	3	2		3
Female to male	Lateral 6 :	1	2	0		3
	Back 2 :	0	0	0		2

表 2-1-2 によると、雄は雌の側部または後部から接近することがわかった。正面で出会った場合は、雌雄互いに接触を嫌い、観察した 13 例中 3 例がマウントに失敗するなど失敗率が高かった。雄が雌に側部から接触した場合、その約 90% がそのまま側部からマウントした。雄が雌の後部から接触した場合、やはり約 90% が後部からマウントした。そして、雄が雌の側部または後部から接触した場合に、雄が雌の正面からマウントした事例は観察されなかった。雄雌が正面で互いに接触した場合では、雄のマウント方向に特徴を認めることは出来なかった。従って、配偶行動の初期に、雄は雌の主に側部や後部から接触してそのままマウントに至ると結論した。

第 3 段階は (Ⅲ-1) と (Ⅲ-2) に分類した。分類した理由は、配偶行動のシーケンスの中で (Ⅰ) → (Ⅱ) → (Ⅲ-1) → (Ⅲ-2) → (Ⅳ) となる場合と (Ⅰ) → (Ⅱ) → (Ⅲ-1) → (Ⅳ) となる場合に分けられたからである。(Ⅲ-1) と (Ⅲ-2) では、*C. anomalus* で報告されたように (Pillai and Winston, 1969) 本種の雄でも第 4 脚を特徴的に折りたたみながら雌に完全に乗り、雌の体表面を第 1 脚と触肢で盛んに触れる。雌の背面上を雄が歩き回っている初期状態を (Ⅲ-1) とし、更に進んで雄が雌の腹壁に回り込んだ状態を (Ⅲ-2) とした。雄条件付け雌導入の実験では、(Ⅲ-1) の段階に至った 56 例 (観察事例 60) 中、(Ⅲ-2) へ至ったものが 34 例で、(Ⅲ-2) を経由せず (Ⅳ) へ至ったものは 18 例及び (Ⅲ-1) から雌雄が離れてしまった事例が 4 例であった。一方、雌条件付け雄導入の実験では、(Ⅲ-1) の段階に至った 38 例 (観察事例 60) 中、(Ⅲ-2) へ至ったものが 27 例で、(Ⅲ-2) を経由せず (Ⅳ) へ至ったものは 7 例及び (Ⅲ-1) から雌雄が離れてしまった事例が 4 例であった。いずれの実験の場合も、(Ⅰ) → (Ⅱ) → (Ⅲ-1) → (Ⅲ-2) → (Ⅳ) の方が主流であった。以上、*C. rodriguezi* の配偶行動を模式化して纏めたものを図 2-1-2 (雄条件付け雌導入) と図 2-1-3 (雌条件付け雄導入) に示した。

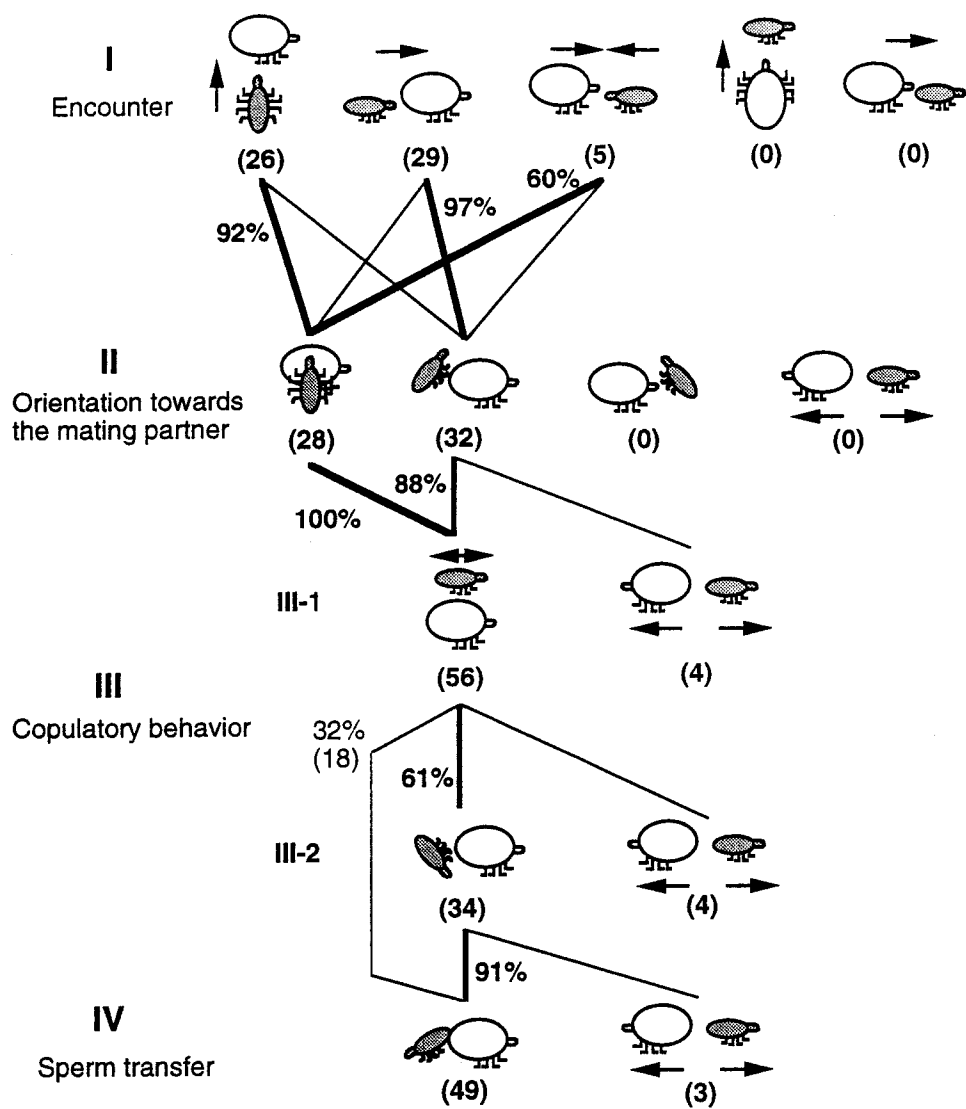


図 2 - 1 - 2 *C. rodriguezi* の配偶行動を模式図  
(雄条件付け雌導入)

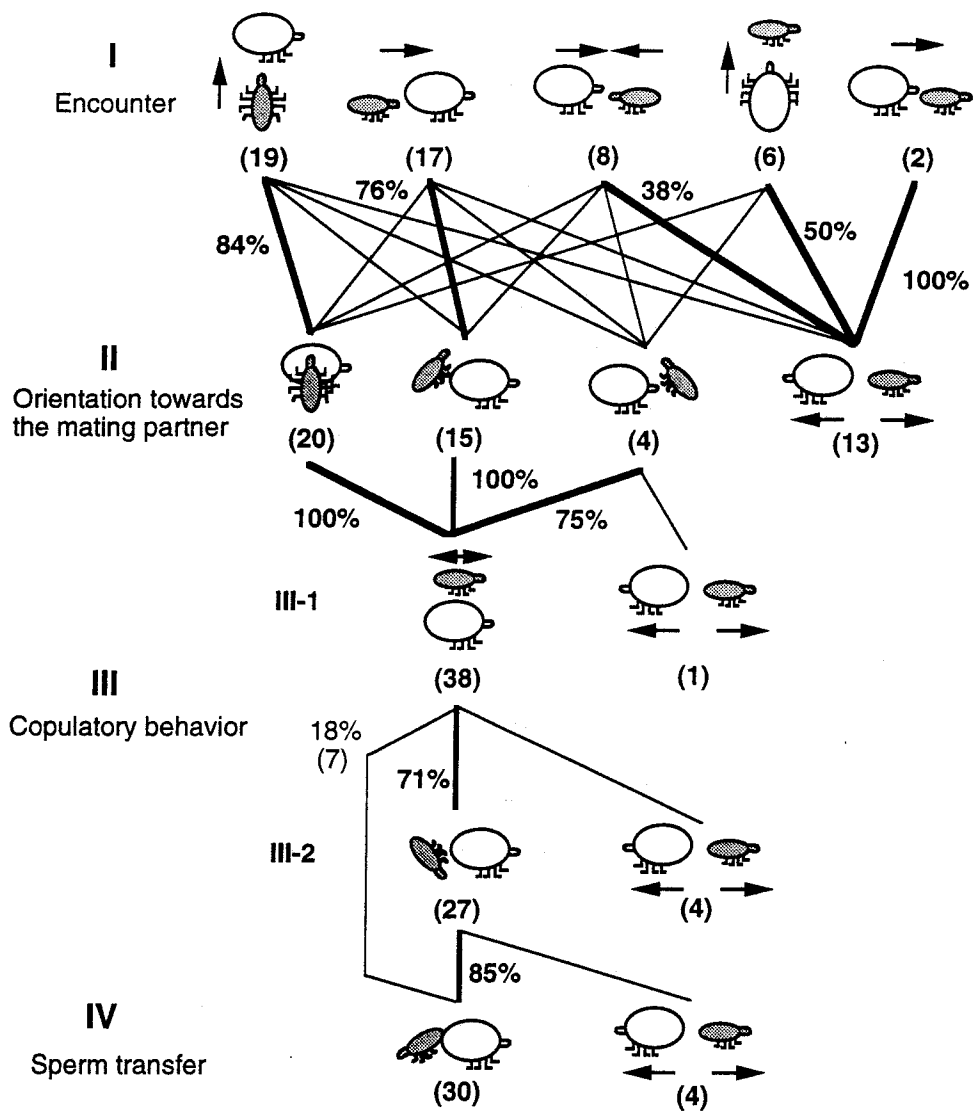


図 2 - 1 - 3 *C. rodriguezi* の配偶行動を模式図  
(雌条件付け雄導入)

第4段階では、他のゴミコナダニ属ダニと同じように、雄は雌の胴体部の上に後ろ向きに乗り出して交尾姿勢を成立させる。この間、雄の生殖器は雌の後胴体部の先端にある交尾囊に挿入される (Pillai and Winston, 1969; Kuo and Nesbitt, 1970)。交尾姿勢中、雌は静止しているものもいれば動き回るものもいた。動き回る雌と交尾中の雄は、雌に動きを任せながら、交尾の体勢を続ける。

一方、雌を条件付けして雄を導入した場合と雌を条件付けして雌を導入した場合における、雄のタッピング行動が観察されるまでに要した時間の分布 (時間分布試験) を図 2-1-4 に示した。15 分間の観察時間内に雄条件付け雌導入の場合は 60 例の全てで雄のタッピング行動が認められたが、雌条件付け雄導入の場合では 60 例中 8 例で雄のタッピング行動が認められなかった。しかし、これら 2 つの実験間で雄ダニのタッピング行動が観察されるまでに要した時間の分布に統計的な有意差は検出されなかった ( $P = 0.461$ ,  $n = 112$ , Mann-Whitney  $U$  test)。

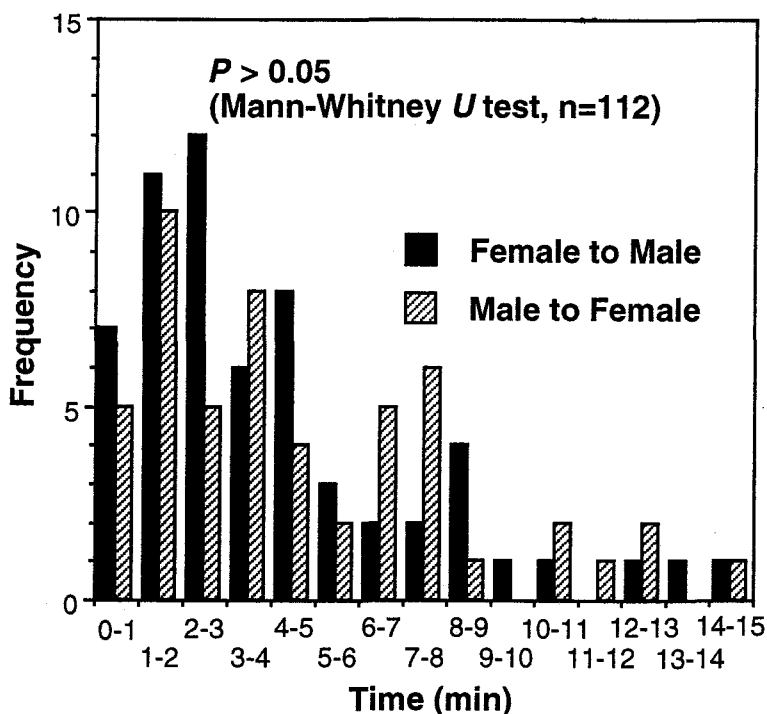


図 2-1-4 雄条件付け雌導入と雌条件付け雄導入における雄のタッピングが認められるまでに要した時間の分布

### 2-2-2 その他の *Caloglyphus* 属 3 種の配偶行動

*Caloglyphus* sp. 1, *C. polyphyllae* 及び *Caloglyphus* sp. 2 について, *C. rodriguezi* の場合と同じ実験を行った. その結果, これらのゴミコナダニ属ダニでも配偶行動のシーケンスは *C. rodriguezi* と同じであり, (I) → (II) → (III-1) → (III-2) → (IV) となる場合と (I) → (II) → (III-1) → (IV) となる場合があった.

本研究で用いたその他の 3 種のゴミコナダニの配偶行動を雄条件付け雌導入の系で観察すると, 配偶行動のシーケンスをはじめ, いかなる点でも *C. rodriguezi* と同様であった. 従って, ゴミコナダニ属ダニはいずれも, 雄条件付け雌導入でも雌条件付け雄導入でも, 雄のタッピングが認められるまでの時間の分布に統計的有意差は無いと考えた. 雄条件付け雌導入の系における *Caloglyphus* sp. 1, *C. polyphyllae* 及び *Caloglyphus* sp. 2 の雄のタッピングが認められるまでの時間の分布は第 4 章に示した.

### 2-3 考察

著者の知る限り, ゴミコナダニ属ダニの配偶行動のシーケンスについての報告は無い. そこで, 本研究ではゴミコナダニ属ダニの性フェロモンを研究するに当たって, 先ず 4 種の配偶行動のシーケンスを明らかにするために観察を行った. 予備試験によると本研究で調べたゴミコナダニ属ダニ 4 種では, その配偶行動は同様と考えられた. そこで, 4 種の中から *C. rodriguezi* を取り上げ, その配偶行動を詳細に検討した.

2-2 で述べたように, *C. rodriguezi* のでは配偶行動の初期段階で, 雄が積極的に雌に働きかけると結論した. 雌が雄に接近すると観察されているアシフトコナダニ (Bozek and Griffiths, 1979; Levinson et al., 1989) とは, 大きく異なる結果となった. 配偶行動の初期段階に雄が積極的に雌に働きかける例は, この他にマダニ科 (Sonenshine et al., 1991) やカブリダニ科 (Tsunoda, 1994) のダニでも報告されている. このように考えると, コナダニ科で初めて性フェロモンが同定されたゴミコナダニ属の *C. polyphyllae*

で、 $\beta$ -acaridial が雄の誘引とマウント行動を解発したことや、雌がダニのヘキサン抽出物には何の反応も示さなかったこと (Leal et al., 1989a) は良く理解できる。また、雌雄の接近の方向やマウントの方向に関しては、雄は雌の主に側部や後部から接触してそのままマウントする。これは、主に雌の側部からマウントするオソアシブトコナダニ (Levinson et al., 1989) とは異なる結果となった。

コナダニ科ダニの後胴体部には油腺 (後胴体部腺, opisthosonotal gland) がある。コナダニ科ダニの一連の有機化学的研究により (Kuwahara, 1991), ダニ虫体をヘキサンで短時間洗うことで得られる体表成分や種々のフェロモンは、後胴体部腺由来であろうと示唆されている。実際、後胴体部腺が顕著に大きなコナダニ科ネダニ亜科未同定種の後胴体部腺に直接濾紙を当てて分泌物を吸い取り、ヘキサン抽出してガスクロマトグラフで分析したところ、虫体全体をヘキサンに浸けて得られた抽出物の分析と全く同じクロマトグラムを与え、体表成分は後胴体部腺で生合成されているとする直接的な証拠が得られている (Kuwahara, unpublished)。また、後胴体部腺で生合成され、貯蔵された警報フェロモンは必要に応じて放出されることが、ケナガコナダニで認められている (Kuwahara et al., 1979)。一方、現在のところ性フェロモンは警報フェロモンの様に積極的に放出されているのか、あるいは後胴体部腺から体表にしみ出して徐々に揮散しているのかどうか判っていない。配偶行動の観察では、雄から雌への接触とマウントは主に側部と後部から起こるが、雌の前胴体部の側部から接触が起こる事例も観察されていることを考えれば、性フェロモンは警報フェロモンのように必要に応じて放出されるのではなく、後胴体部腺から体表全体にしみ出しているものと、現在のところ考えている。

マウント後の (Ⅲ-1) で、雄は雌の体表面を脚や触肢で盛んに触れるように見受けられる。このような行動はマダニ科でも知られており、同種認識がこの段階で成されていると考えられている。カクマダニ属の一種 *Dermacentor variabilis* で、この行動を解発するマウント性の性フェロモン



として cholesteryl olate が同定されている (Hamilton et al., 1989) . (Ⅲ-2) では雄ダニが雌の腹壁に回り込む場合が見られた. この様な行動はマダニ科では一般に見られるが, ゴミコナダニ属ダニでは必須のシーケンスではない. 更にマダニ科ダニでは生殖腺にも性フェロモンのあることが知られており, 確実な同種認識へ導く機能のフェロモンと考えられている (Allan et al., 1989) . 今回認められた *C. rodriguezi* の行動から考えると, コナダニ科にも同様な同種認識に機能するフェロモンの存在する可能性はあるが, これらの観点からの研究報告例はない. 図 2-3 に, ゴミコナダニ属ダニの典型的な配偶行動のシーケンスを示す.

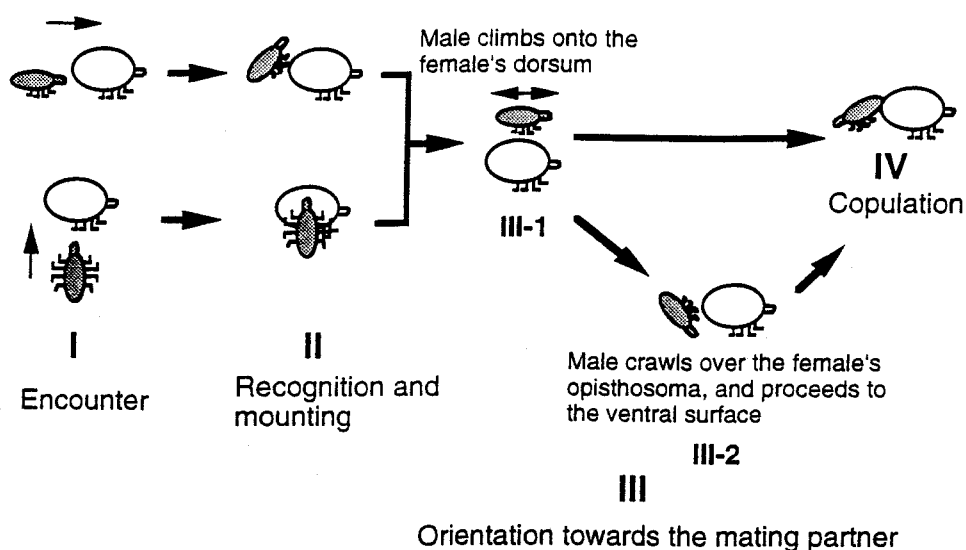


図 2-3 ゴミコナダニ属ダニの典型的な配偶行動のシーケンス

## 2-4 実験の部

### 材料

観察に用いたゴミコナダニ属ダニ *Caloglyphus* spp. (Acarina: Acaridae) は以下の4種である. 未同定種 *Caloglyphus* sp. 1は, 京都大学構内で1993年に採取したコフキコガネ *Melolontha japonica* Burmeister (Coleoptera: Scarabaeidae) に付着していたヒポプスから育て, 乾燥酵母を飼料として, 継代飼育した. *C. rodriguezi* Samsinakはつくば市の畑土より分離され, 筑波

大学動物制御学研究室で累代飼育されていた。 *C. polyphyllae* Zakhvatkin は 1994年 8月愛媛県の小田深山で採集されたヒゲコガネ *Poluphyllae laticollis* Lewis (Coleoptera: Scarabaeidae) に付着したヒポプスより得られた。未同定種 *Caloglyphus* sp. 2 は東京都で採集されたナガチャコガネ *Heptophylla picea* Motshulsky (Coleoptera: Scarabaeidae) よりヒポプスとして得た系統である。

いずれも、濾紙を敷いたシャーレ（内径：85 mm，高さ：20 mm）内で乾燥酵母を水で粘土状に溶いた飼料として与え，20℃または室温で飼育した。シャーレは2枚ずつジッパー付ナイロン製の袋（240 mm × 170 mm × 0.04 mm）に入れ，湿度の低下を防いだ。

### 生物試験方法

ミニシャーレ（内径：10 mm，高さ：5 mm）に濾紙を2枚敷き，水を一滴落として湿らせた。飼料を少量枝付バリで濾紙上に置き，更に十分に成熟した雌（または雄）一頭を導入した。導入後，ダニが逃げないようにカバークラスで蓋をした。乾燥を防ぐため，水で十分湿らせた綿の入ったガラス容器と，ミニシャーレ5個をプラスチックシャーレ（内径：85 mm，高さ：20 mm）に移し入れた後，これを数時間放置して条件付けした。その後，ストックカルチャーから十分に成熟した雄（または雌）一頭を出来る限り刺激ないように枝付バリでそれぞれのミニシャーレに入れた。また，導入時にダニに与える影響を考えて，雄条件付け雌導入と雌条件付け雄導入の2通りで配偶行動を観察した。ミニシャーレ内の配偶行動の観察は室温下ハロゲンランプ（6V-10W）で照明しながら，実体顕微鏡下に行った。ゴミコナダニ属ダニは多回交尾をすることが知られている。本実験ではストックカルチャー中より交尾中でない雄または雌を無作為に選抜した。従って，ミニシャーレ内でペアを組む雌雄はいずれも交尾経験済みのダニと思われる。

雄と雌の接触から交尾姿勢の成立までの基本パターンの分類は予備実験50例の観察から得た。また，観察時間は85%以上の雌雄間で交尾姿勢が成

立する 15 分間とした。

また、雄を条件付けして雌を導入した場合と雌を条件付けして雄を導入した場合の 2 通り方法で、ミニシャーレ中でペアにしてから雌雄のダニの接触の有無と、接触に至る方向性及びマウントの方向性を観察し、整理した。更に、マウントの際に雄が雌の体表を両第 1 脚で交互にトントン叩く“タッピング行動”には特に注目し、タッピング行動を観察されるまでに要する時間を計測した（時間分布試験）。*C. rodriguezi* では各実験で 60 例ずつ観察し、合計 120 のデーターを得た。その他のゴミコナダニ属ダニでは雄条件付け雌導入の系で 30 例ずつ観察した。上述の 2 通りの実験群間におけるタッピング行動の観察されるまでに要する時間分布の有意差検定は、ノンパラメトリックな独立 2 群間の検定に用いられる Mann-Whitney *U* test (Stat View II) 法により行った。

### 第3章 ゴミコナダニ属ダニの性フェロモンの同定

#### 3-1 緒言

第2章で述べたように、ゴミコナダニ属ダニの配偶行動の初期段階では、雄がより積極的に雌に働きかけると結論した。これは、アシプトコナダニやオソアシプトコナダニで認められたような、雄の性フェロモンの存在を否定するものではない。しかし、ダニ抽出物が雌に何の活性をも引き起こさないとされる現段階では、雄の行動の活性化がゴミコナダニ属ダニの配偶行動で初期段階に重要であると考えた。

コナダニ科ダニで初めて雌の性フェロモンが同定された *C. polyphyllae* では、 $\beta$ -acaridial が雄の誘引活性とマウント行動の活発化を引き起こしたと報告されている (Leal et al., 1989a)。実際に配偶行動を観察すると、*C. polyphyllae* の雄は逃げる雌を雄が追いかける例もあるが、雌がすぐ横にいるにも関わらずなかなか接触しない例も多く見られた。即ち、雌は何らかの手段で雄を誘引すると思われるが、昆虫で一般に認められている性フェロモンほどその活性は強くないと考えた。一方、飼育容器中の母集団では1頭の雌に複数の雄がマウントしている場合や、交尾中のペアの近傍で雄同士がマウントしようとしている場合も頻繁に観察できる。これは、雌の存在が雄のマウント行動を活発化したと考えらる。以上、雌雄の接近では雌の放出する  $\beta$ -acaridial に雄が誘引され、更にマウント行動が解発されると解釈した。

従って、これらの観察結果からゴミコナダニ属ダニでは、雄に誘引活性を示す因子とマウント行動を活発化する因子の存在を仮定した。先ず、雄の行動を指標としてダニのヘキササン抽出物について検討し、化学的因子すなわちフェロモンの関与を調べた。上述したように、*C. polyphyllae* では雄の誘引活性とマウント行動の活発化の両方の機能を  $\beta$ -acaridial が有し、雌性フェロモンと同定されている。*C. polyphyllae* と同じように、他のゴミコナダニ属ダニでも雌性フェロモンが存在し、そのフェロモンが雄の誘引活性とマウント行動の活性化の2つの機能を有すると統一的に解釈できるのか否かは、

大変興味深い問題である。

### 3-2 *Caloglyphus* sp. 1の雌の性フェロモン

#### 3-2-1 雌の性フェロモンの単離と構造決定

本実験に用いた生物試験法の概要を図3-2-1に示した。定性的な評価法としての濾紙法と、定量的な評価としてのガラス棒法である。生物試験法の詳細は「実験の部」に示した。

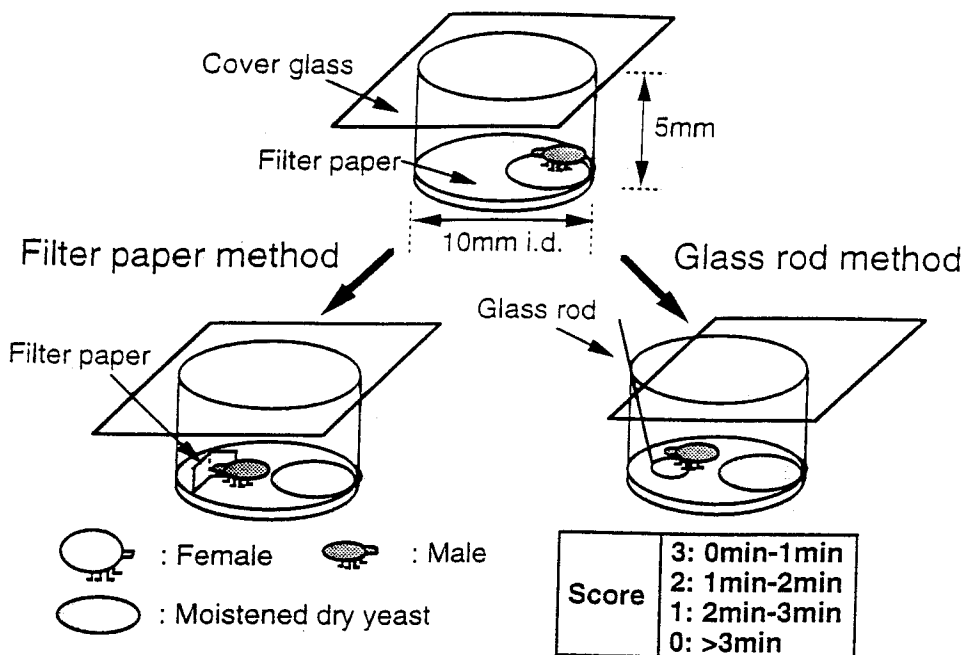


図 3-2-1 *Caloglyphus* sp. 1 の雌の性フェロモン検定に用いた生物試験法

ミニシャーレ内で十分に条件付けすると、10頭の雄のほとんどは飼料の上に留まっている。この状態の時に、可能な限り雄に影響を与えないように試料を含ませた濾紙をミニシャーレの中央部に置いた。なお被験濾紙は試料のヘキサン溶液をマイクロシリンジで塗布し、溶媒を揮散させて調整した。試料の挿入後、雄は飼料の上から濾紙へ移動し、濾紙に執着する行動や、濾紙の近傍で雄同士がマウント行動を示す。濾紙に執着する雄には、第2章で

述べたタッピング行動が認められた。即ち、雄の誘引活性とマウント行動の活性化が雌のヘキサン抽出物で同時に見出されたことになる。これら活性の力価はヘキサン抽出物で 0.1 雌当量と評価できた。しかし、誘引活性は実験毎に変動した。誘引活性のばらつく原因は現在のところ不明である。その解明には、今後詳細な設定条件の検討が必要と思われる。このような理由から誘引活性は、活性画分の確認という定性的な評価にのみ用いることとした。これに対して、マウント行動の活性化は安定して評価できた。

雌のヘキサン抽出物を用いたガスクロマトグラフ分析と、誘引活性を指標としてフェロモンを精製した。その結果を図 3-2-2 に示す。後述のように、ピーク 1（保持時間：8.04分）は epoxyneral と同定された。ピーク 2（保持時間：12.02分）はガスクロマトグラフ-質量分析装置で、 $M^+$ イオンを  $m/z$  210 (21.3%)、基準ピークを  $m/z$  41 (100%) に、その他の開裂イオンを  $m/z$  182 (5.25%), 125 (10.5%), 97 (77.2%), 57 (61.3%), 57 (61.3%), 55 (87.9%) 及び 43 (90.2%) に与え、pentadecene と推定した。ピーク 3（保持時間：14.32分）はガスクロマトグラフ-質量分析装置で、 $M^+$ イオンを  $m/z$  236 (26.5%)、基準ピークを  $m/z$  67 (100%) に、その他の開裂イオンを  $m/z$  124 (14.7%), 123 (11.8%), 110 (32.5%), 109 (24.9%), 96 (46.7%), 95 (50.8%), 82 (58.9%), 81 (75.1%), 43 (42.0%) 及び 41 (73.4%) に与えることから、heptadecadiene と考えられた。同様に、ピーク 4（保持時間：14.43分）は  $M^+$ イオンを  $m/z$  238 (24.0%)、基準ピークを  $m/z$  43 (100%) に、その他の開裂イオンを  $m/z$  126 (5.3%), 125 (12.6%), 112 (13.8%), 111 (32.1%), 98 (19.1%), 97 (58.0%), 84 (35.0%), 83 (66.0%), 70 (47.5%), 69 (82.3%), 57 (70.4%), 55 (88.4%) 及び 41 (93.6%) に与え、heptadecene と推定した。これら不飽和炭化水素類の二重結合の位置や幾何構造は検討していない。

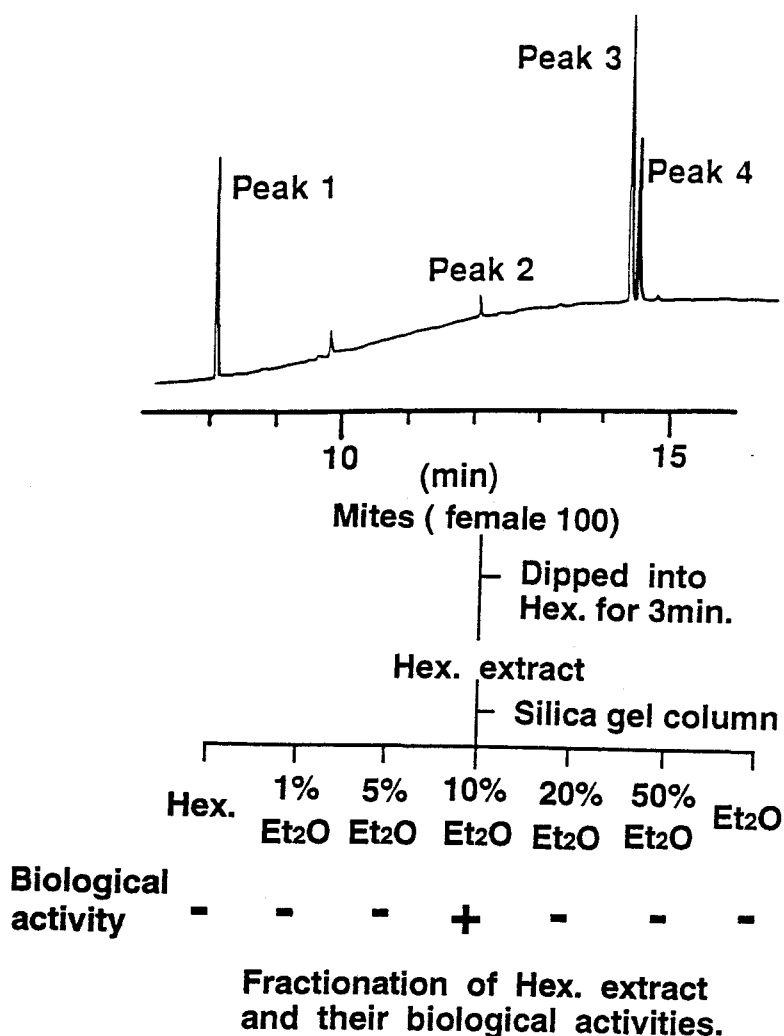


図3-2-2 雌のヘキサン抽出物のガスクロマトグラムと  
誘引活性を指標にした精製過程

雌ダニ100頭のヘキサン抽出物をシリカゲルカラムに吸着させヘキサン/エーテルの混合液で段階的に溶出した。各フラクションを濾紙法により検定した結果、0.1雌ダニ当量で10%エーテル含有ヘキサン溶出部にのみ雄ダニ誘引活性が認められた。また、導入した濾紙の近傍では雄同士のカップリングも認められた。10%エーテル含有ヘキサン溶出部はガスクロマトグラフ法でピーク1の単一成分を示した。このピーク1をガスクロマトグラフ-質量分析装置で分析したところ、基準ピークを $m/z$  41 (100%) に与え、その他の

開裂イオンとして  $m/z$  153 (0.6%), 150 (1.5%), 135 (6.0%), 109 (40%) 及び 69 (73%) を与えた. 図 3-2-3 に活性体の質量スペクトルを示す. これらの結果は, オオケナガコナダニ *Tyrophagus perniciosus* から同定された新規化合物 (2*S*,3*S*)-epoxyneral の質量分析における開裂様式 (Leal et al., 1989c) 及びガスクロマトグラフ法の保持時間と一致した. 従って, *C. polyphyllae* と同様に, *Caloglyphus* sp. 1 で epoxyneral は雄の誘引活性とマウント行動の活性化を引き起こすと考えた. Epoxyneral には (2*S*, 3*S*)-体と (2*R*, 3*R*)-体の両異性体が可能である. 天然物の立体化学を決定するために, 両異性体をそれぞれ合成した.

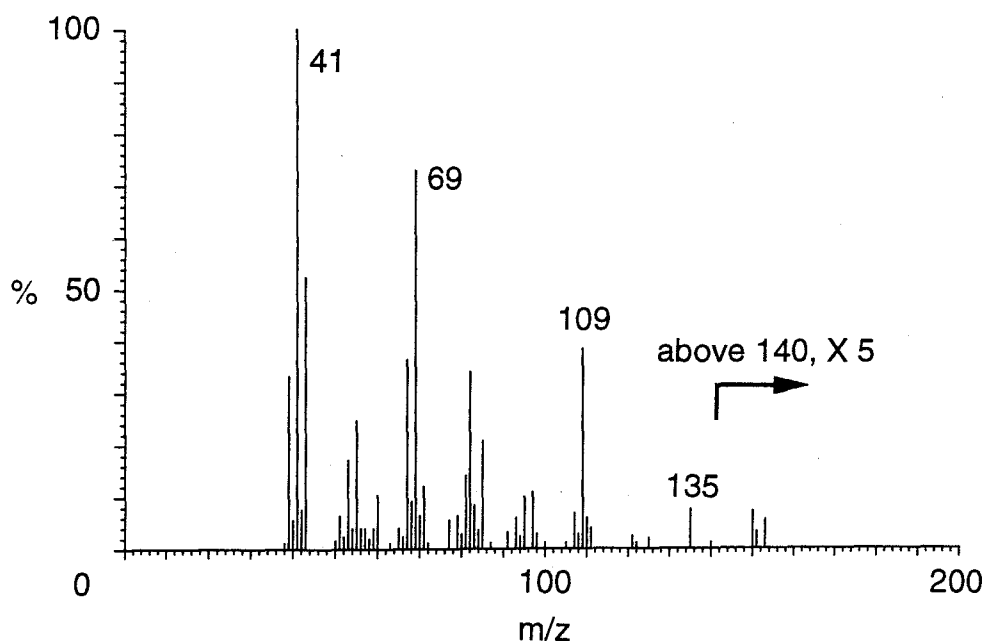


図 3-2-3 雄の誘引活性とマウント活性を示す化合物の質量スペクトル



(2*S*, 3*S*)- 及び (2*R*, 3*R*)-epoxyneral (2, 3-epoxy-3, 7-dimethyl-6-octenal) は次のように合成した (図 3-4-2) . Nerol をシャープレスの不斉エポキシ化反応 (Katsuki and Sharpless, 1980) で酸化後, アルコールをアルデヒドに酸化した (Corey and Schmidt, 1979) . 予備試験で得られた (2*S*, 3*S*)- と (2*R*, 3*R*)-epoxyneral の両鏡像体標品の光学純度を測定したところ, いずれも 77% ee であり, 生物試験に用いるには光学純度が低くすぎると考えられた. そこで, 光学純度の向上のため, 不斉酸化で得られたエポキシアルコールを 3, 5-dinitrobenzoyl chloride と反応させ 2, 3-epoxy-3, 7-dimethyl-6-octenyl 3, 5-dinitrobenzoate に導き, その結晶化による精製を試みた (Mori and Ebata, 1986) . 再結晶化を繰り返したところ, 予想に反して結晶よりも母液から光学純度の高いベンゾエートを得た. 得られた母液由来のベンゾエートを加水分解し, そのアルコールをアルデヒドへ酸化して, それぞれ目的の (2*R*, 3*R*)-epoxyneral (97% ee) 及び (2*S*, 3*S*)-epoxyneral (96% ee) とした. (2*S*, 3*S*)- 及び (2*R*, 3*R*)-epoxyneral の合成過程の略図を図 3-2-4 に示した. また, (2*R*, 3*R*)-epoxyneral の <sup>1</sup>H-NMR を図 3-2-5 に示した.

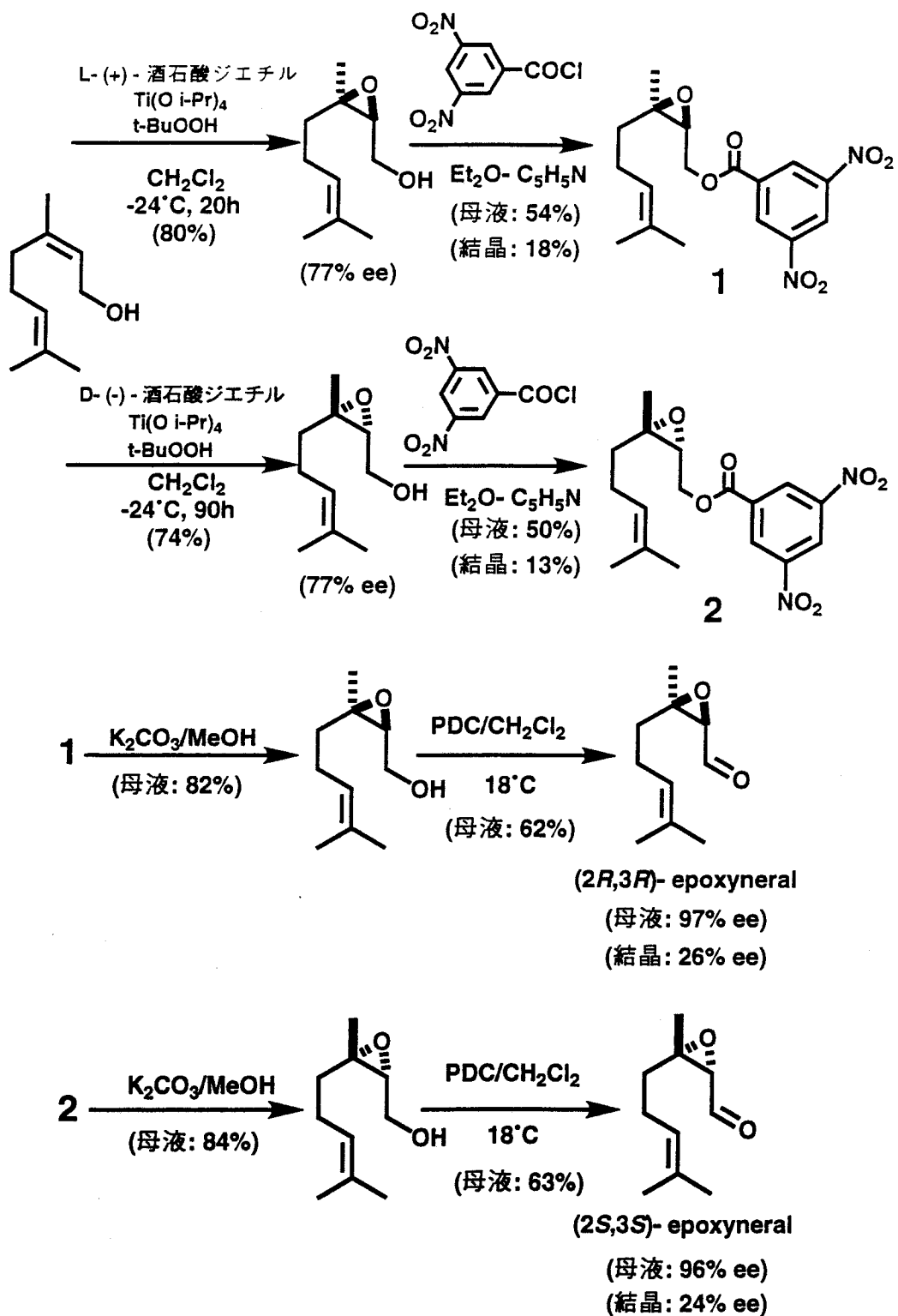


図3-2-4 (2*S*,3*S*)-及び(2*R*,3*R*)-epoxyneralの合成過程

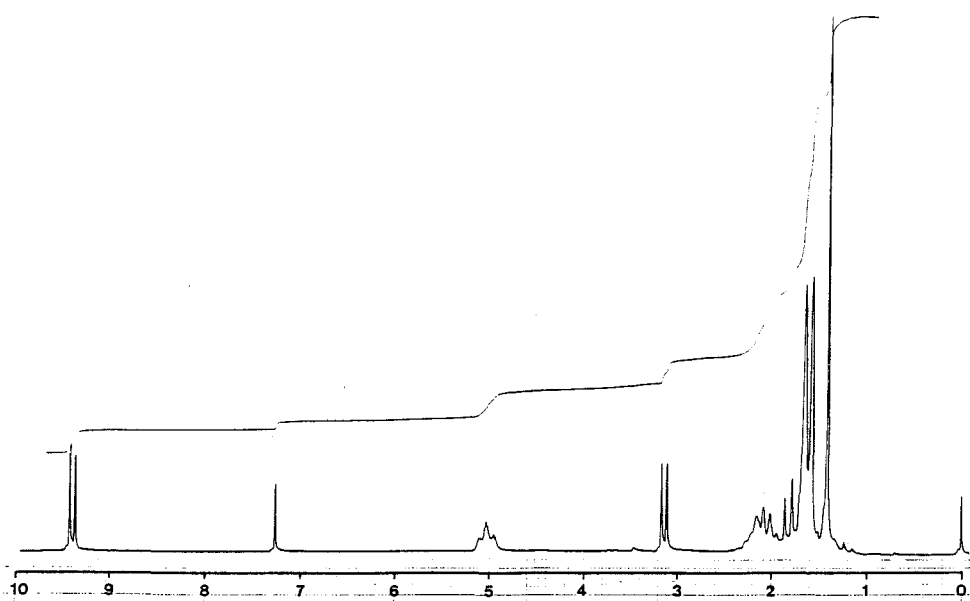


図3-2-5 合成した (2*R*, 3*R*)-epoxyneral の<sup>1</sup>H-NMRスペクトル

固定層にキラル化合物を塗布したキャピラリーカラムで合成化合物をガスクロマトグラフ分析すると、(2*S*, 3*S*)- 及び (2*R*, 3*R*)-epoxyneral の保持時間はそれぞれ16.4分及び16.7分と観測できた。天然物と合成品の保持時間の比較や co-injection の結果から、図3-2-6に示したように、天然物は (2*R*, 3*R*)-epoxyneral と同定できた (Mori and Kuwahara, 1995) 。上述したようにオオケナガコナダニから新規化合物として (2*S*, 3*S*)-epoxyneral が同定されているが、そのコナダニにおける生理活性は判っていない (Leal et al., 1989c) 。今回、その鏡像体の (2*R*, 3*R*)-epoxyneral が天然から初めて生理活性物質として単離・同定できた。

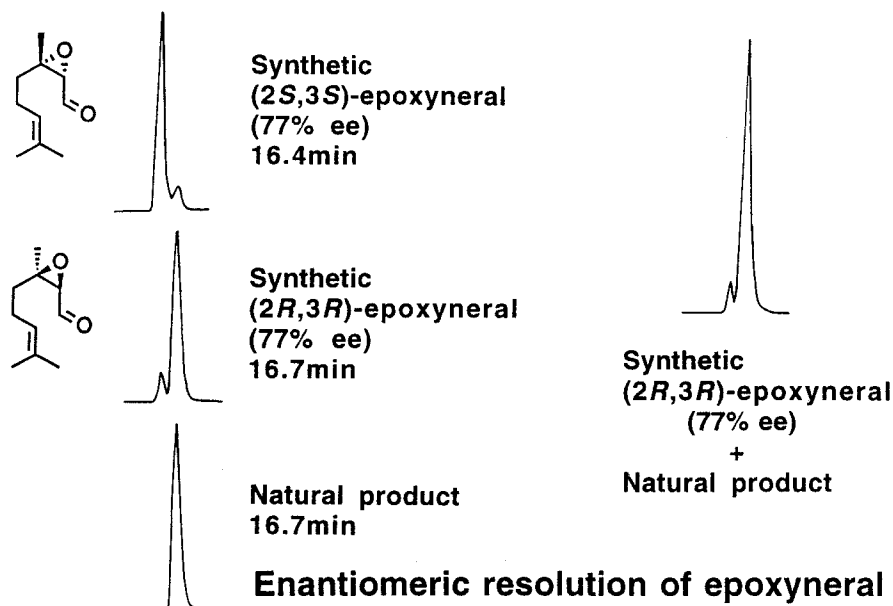


図 3 - 2 - 6 Epoxyneral の光学分割

### 3 - 2 - 2 合成 epoxyneral を用いたフェロモン活性

合成 epoxyneral を用い、雄ダニのマウント活性をガラス棒法によって定量的に評価した。用いた試料の光学純度は (2*S*, 3*S*)-epoxyneral が 96% ee, (2*S*, 3*S*)-epoxyneral が 77% ee 及び (2*R*, 3*R*)-epoxyneral が 97% ee であり、それぞれ (2*R*, 3*R*)-epoxyneral (97% ee), (2*S*, 3*S*)-epoxyneral (77% ee), (2*S*, 3*S*)-epoxyneral (96% ee) と表示した。得られた結果を図 3 - 2 - 7 に示す。全ての試料で用量-反応曲線が、薄くても濃くても活性の低下する凸の関係となった。(2*R*, 3*R*)-epoxyneral (97% ee) では活性の極大値は 0.1 ng と 1 ng (Kruskal-Wallis, 共に  $P < 0.01$ ) に、(2*S*, 3*S*)-epoxyneral (77% ee) では 1 ng と 10 ng (Kruskal-Wallis, それぞれ  $P < 0.05, 0.01$ ) に、(2*S*, 3*S*)-epoxyneral (96% ee) では 10 ng と 100 ng (Kruskal-Wallis, それぞれ  $P < 0.01, 0.05$ ) に認められた。供試試料それぞれの活性は、「考察」に示したように至適濃度の中の (2*R*, 3*R*)-異性体の量に関連していると結論できた。従って、活性体は (2*R*, 3*R*)-異性体であり、その鏡像体の (2*S*, 3*S*)-体は (2*R*, 3*R*)-体の活性発現

を阻害しないことが明らかになった。

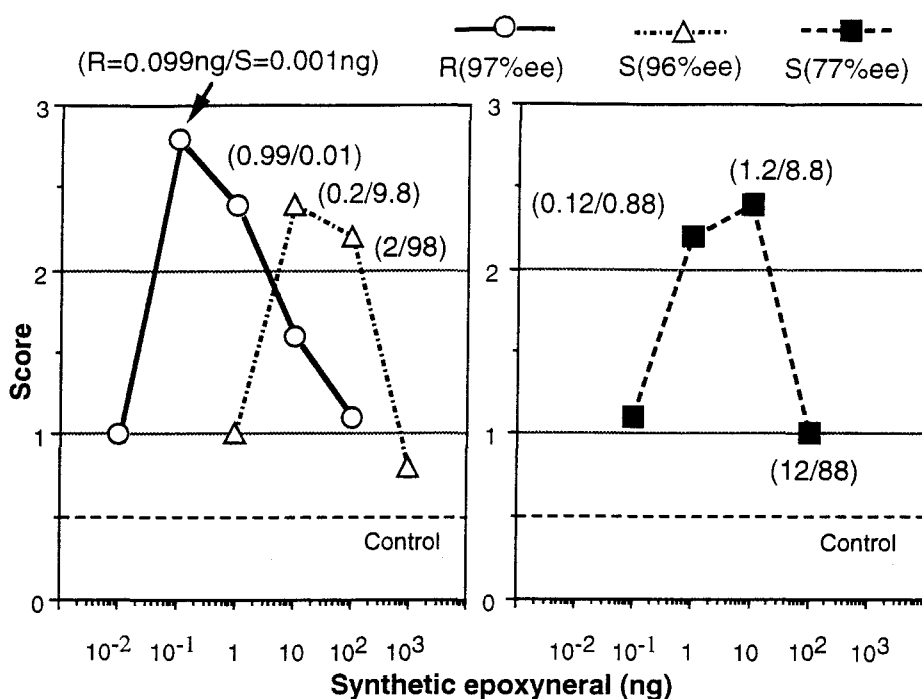


図3-2-7 雄ダニマウント活性の定量的評価

### 3-2-3 雌の性フェロモンの分布様式

雄の誘引活性とマウント行動の活性化を引き起こす雌の性フェロモンは、雌ばかりではなく雄や第1若虫にも、主要成分として存在する。(2R, 3R)-epoxyneral (97% ee) の存在を雌、雄及び第1若虫で調べた。結果を図3-2-8に示す。それぞれの含有量は、雌が  $25.7 \pm 2.2$  ng (平均値  $\pm$  SE,  $n = 30$ ), 雄が  $18.0 \pm 2.0$  ng (平均値  $\pm$  SE,  $n = 30$ ) 及び第1若虫で  $3.4 \pm 0.5$  ng (平均値  $\pm$  SE,  $n = 10$ ) であった。また、雌雄間での雌性フェロモンの含有量の差は平均値で雌：雄=1.43：1であるが、その分布には図3-2-9に示したように有意差が認められた (Mann-Whitney  $U$  test,  $P < 0.05$ ,  $n = 60$ )。

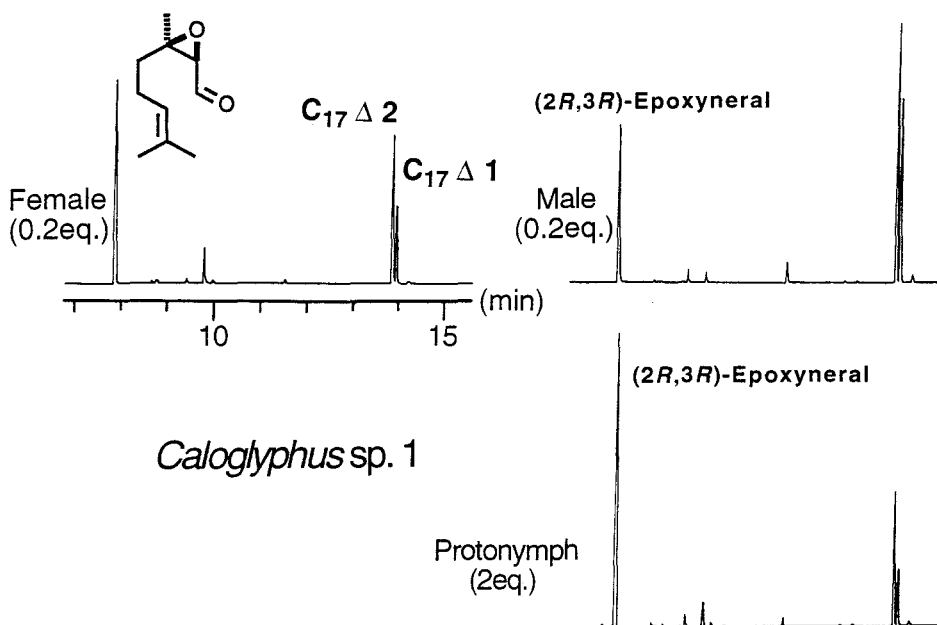


図 3 - 2 - 8 雌, 雄及び第 1 若虫ヘキサン抽出物のガスクロマトグラム

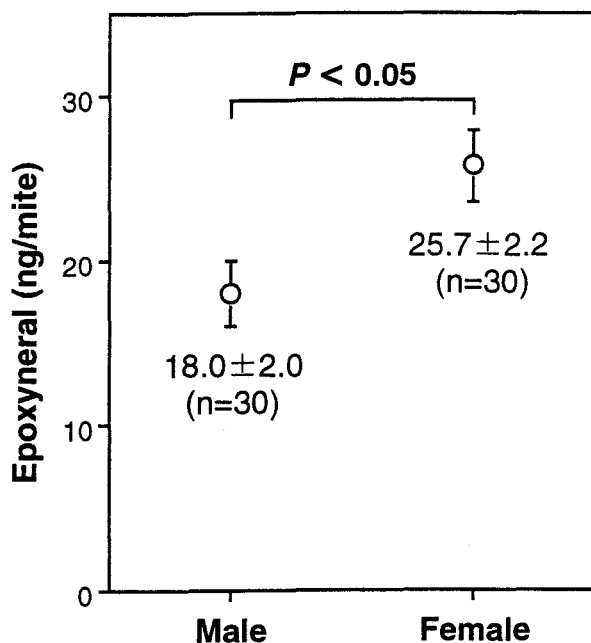


図 3 - 2 - 9 雌雄間における雌の性フェロモンの含有量の比較

以上の結果を総合すると、雄に含まれるフェロモン量で、雄に十分に誘引活性やマウント行動を解発できることになる。そこで、雄のヘキサン抽出物と雌のヘキサン抽出物で、雄のマウント行動に対する活性に差があるかどうか、ガラス棒法により定量的に評価した。結果を図3-2-10に示す。結果的には雌雄間で活性の力価に差は無く、いずれも0.1ダニ当量で極大の活性を示した。また、雌雄ともに等しく、そのヘキサン抽出物の用量-反応曲線が、最適用量の存在する凸の関係になった。

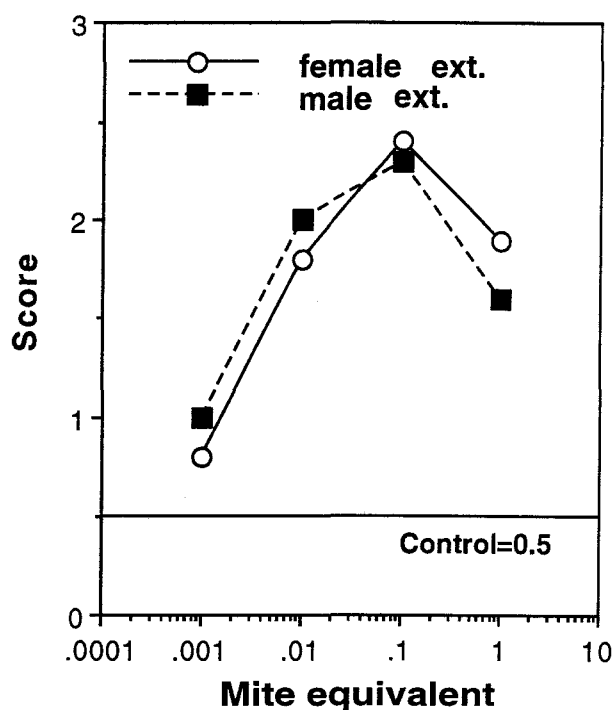


図3-2-10 雌及び雄のヘキサン抽出物に対する雄のマウント活性

#### 3-2-4 考察

ヒポプスとしてコフキコガネダニから採集できるゴミコナダニ属の未同定種コナダニ *Caloglyphus* sp. 1 から、(2R, 3R)-Epoxyneral を雌の性フェロモンとして同定した。この雌の性フェロモンは *C. polyphyllae* (Leal et al., 1989a) の場合と同様、雄の誘引活性とマウント行動の活発化を引き起こすと結論した。濾紙に誘引された雄ダニはタッピング行動を示し、誘引活性の

定性的な評価となりえたが、常に安定して誘引活性を認めることはできなかった。*Caloglyphus* sp. 1 の雄に見られる誘引活性は、昆虫に見られるように強力ではないと、現在のところ考えている。雌の性フェロモンが既知のコナダニ類 3 種 *C. polyphyllae* (Leal et al., 1989a), ムギコナダニ *Aleuroglyphus ovatus* (Kuwahara et al., 1992) 及びオソアシブトコナダニ *Acarus immobilis* (Sato et al., 1993) でそれぞれ、雄のマウント行動を活性化させることは、いずれも確認されている。更に、オソアシブトコナダニでは雄のマウント活性の用量-反応の関係が凸の曲線で示されており、*Caloglyphus* sp. 1 と同じである。

昆虫ではフェロモン活性と立体化学の関係が詳細に検討され、次に示すように 10 グループに分類されている (Mori, K. 1989; 森謙治 1994)。

- 1) 一方の鏡像体だけが生物活性を示し、他方はフェロモンの活性発現を阻害しない。
- 2) 一方の鏡像体だけが生物活性を示し、他方はフェロモンの活性発現を阻害する。
- 3) 一方の鏡像体だけが生物活性を示し、そのジアステレオマーはフェロモンの活性発現を阻害する。
- 4) 天然フェロモンは 1 つの鏡像体だが、そのジアステレオマーの 1 つにも同様に活性がある。
- 5) 天然フェロモンは 1 つの鏡像体だが、全ての立体異性体が生物活性を示す。
- 6) 同属の昆虫でも、種が違えば異なる鏡像体をフェロモンとして用いる。
- 7) 活性発現には両鏡像体が必要である。
- 8) 1 つの鏡像体が天然フェロモンと同様に活性だが、そのジアステレオマーを混ぜると活性が増強される。
- 9) 一方の鏡像体が雄に、他方は雌に活性を示す。
- 10) メソ体のみが活性を示す。

本研究では、光学純度 100% ee の試料を得ることができなかったため、3 種類の光学純度の合成品を用いて生物試験を行った。その結果、(2*R*, 3*R*)-epoxyneral (97% ee) は 0.1 ng と 1 ng で、(2*S*, 3*S*)-epoxyneral (77% ee) は 1 ng と 10 ng で、(2*S*, 3*S*)-epoxyneral (96% ee) は 10 ng と 100 ng で活性を示した。光学純度を考えると、(2*S*, 3*S*)-体の試料中にも少量の (2*R*, 3*R*)-体が含まれることになる。即ち、(2*S*, 3*S*)-epoxyneral (77% ee) の 1-10 ng 中には 0.115-1.15 ng の (2*R*, 3*R*)-体が、(2*S*, 3*S*)-epoxyneral (96% ee) の 10-100 ng



中には 0.2-2.0 ng の (2*R*, 3*R*)-体が含まれると、それぞれ計算できる。これらの (2*S*, 3*S*)-体サンプル中の (2*R*, 3*R*)-体の量は、(2*R*, 3*R*)-epoxyneral (97% ee) が活性を示した 0.1-1.0 ng の範囲と良く一致する事が判る。従って、雌の性フェロモンとしては (2*R*, 3*R*)-epoxyneral のみが活性を示し、その鏡像体の (2*S*, 3*S*)-epoxyneral はフェロモン活性の発現を阻害しないと結論できた。これは、上述の 10 グループの中では 1) に分類される。コナダニ科における光学活性フェロモンの例は、本種の他に 2 例で知られている。1 つはハウレンソウケナガコナダニ *Tyrophagus similis* の警報フェロモンとして同定されている (*S*) (+)-isopiperitenone である (Kuwahara et al., 1987)。合成した鏡像体の (*R*) (-)-isopiperitenone の活性は (*S*)-体よりも弱く、この活性は (*R*)-体中に微量に混在した (*S*)-体によると考えられた。従って、ハウレンソウケナガコナダニの警報フェロモン場合も、鏡像体の一方が活性を示し、他方はその活性発現の阻害をしないと結論されており、グループ 1) に分類できる。もう 1 つはコオノホシカダニ *Lardoglyphus kono*i の集合フェロモンとして同定された (1*R*, 3*R*, 5*R*, 7*R*)-1, 3, 5, 7-tetramethyldecyl formate (Lardolure) である (Kuwahara et al., 1994)。この化合物はサトウダニ *Carpoglyphus lactis* にも集合活性を有するカイロモンとして作用する。鏡像体である (1*S*, 3*S*, 5*S*, 7*S*)-体は、それぞれのダニに対して、フェロモンとしてもカイロモンとしても作用しない。また、(1*R*, 3*R*, 5*R*, 7*R*)-体と (1*S*, 3*S*, 5*S*, 7*S*)-体の混合物による生物試験の結果は、(1*S*, 3*S*, 5*S*, 7*S*)-体の混入がコオノホシカダニに対する (1*R*, 3*R*, 5*R*, 7*R*)-体のフェロモン活性の発現を阻害したが、サトウダニに対するカイロモン活性を阻害しなかった。従って、集合フェロモンとしては、Lardolure は上述のグループ分けの 2) に分類できる。今後も、フェロモンとしての光学活性化合物と生物活性の関係が、ダニ目でも広く解明されるものと思われる。

### 3-2-5 実験の部

#### ダニ

本実験で用いたゴミコナダニ属未同定種コナダニの由来と飼育方法は2-4に示した。コナダニ科ダニとコフキコガネに見られるようなダニと昆虫の関係は *phoresy* と呼ばれ、昆虫がダニの生息域の拡大や分散に加担している。ダニと昆虫は互いに相手が固定しており、ダニからみて相手の様々な科の決まった昆虫を *phoretic host* と言っている (Houck and O'Connor, 1991)。また、分類の一つの指標として利用されている。

### 生物試験方法

本実験では濾紙法とガラス棒法の2つの生物試験法を用いた。ミニシャーレ (内径: 10 mm, 高さ: 5 mm) に濾紙を2枚敷き、乾燥酵母に水を加えて粘土状とした飼料を少量、濾紙上に置いた。ストックカルチャーからミニシャーレ内に枝付バリで10頭の雄ダニを導入した後、ダニが逃げないようにカバーグラスで蓋をした。ミニシャーレは5個ずつ纏めてプラスチックシャーレ (内径: 85 mm, 高さ: 20 mm) に入れ、水を含ませた綿を入れたガラス容器を加えて、湿度の低下を防ぎながら、数時間雄ダニの条件付けを行った。ここに、以下に示すように濾紙法またはガラス棒法により、試料を与えた。生物試験は全て室温で行い、ヘキサン処理をコントロールとした。

濾紙法 上述のように条件付けした後、一定量のサンプルを塗布した濾紙 (3 mm×3 mm) を雄に影響を与えないようにほぼ中央に置いて、雄ダニの行動を5分間観察した。濾紙法では、雄が濾紙に執着する際に示すタッピング行動に特に注目した。

ガラス棒法 先端をほぼダニの大きさの卵形 (1 mm×0.5 mm) に膨らませたガラス棒を作り、その卵形の先端にサンプルを塗布した。溶媒を揮散した後、先端をダニの近傍に置くようにガラス棒を挿入する。ガラス棒を挿入してから1分以内に雄10頭のうちいずれかの個体が、卵形の先端にマウント行動を仕掛けた場合には3点、2分以内の場合には2点、3分以内には1点及び3分経過後も反応が見られない場合には0点と評価した。この試験は10-20回繰り返し行い、得られたスコアを Kruskal-Wallis 法で評価した後、

Dann の方法に従って多重比較して（高木正見，1985），活性を定量的に評価した。

#### 抽出，サンプル調整及び精製

フェロモンの定量には底を紡錘形に細工したガラス製チューブ（外径：8 mm，高さ：30 mm，手製）を用いた．内部標準として octadecane 50 ng を含むヘキサン 5  $\mu$ L の入ったチューブに，雌1頭（交尾の経験を問わない）を枝付バリで入れる．ダニを入れてから3分後，ヘキサン部分を1  $\mu$ L（0.2 当量）マイクロシリンジで抜き取り，ガスクロマトグラフ法（条件は後述）で分析する．雄も雌と同じように抽出・分析した．一方，第1若虫は5頭を5  $\mu$ L のヘキサン（50 ng の octadecane を含む）で抽出し，1  $\mu$ L（1 当量）をガスクロマトグラフ法で分析した．これらの実験より得られた (2*R*, 3*R*)-epoxyneral / octadecane のピーク比を，予め作製した合成 (2*R*, 3*R*)-epoxyneral と octadecane の検量線 ( $r^2 = 0.999$ ) に代入して，ダニ虫体から抽出された (2*R*, 3*R*)-epoxyneral 量を算出した．この方法によるフェロモン定量のためのサンプル数は，雄・雌共に20頭ずつ計40頭である．雌雄間のフェロモン含量の統計学上の有意差の検定は，ノンパラメトリックな独立2群間の検定に用いられる Mann-Whitney *U* test (Stat View II) により行った．

雌雄のヘキサン抽出物に対する雄の反応をガラス棒法で評価する際，各サンプルは以下のように調整した．3頭の雌ダニを300  $\mu$ L のヘキサンに3分間浸漬し1  $\mu$ L をガラス棒の先端に塗布した場合，これは0.01 雌ダニ当量に当たる．ダニ当量の基準を要するサンプルは全て同じ方法で調整した．

雌ダニ100頭（交尾の経験を問わない）をヘキサン100  $\mu$ L に浸漬し，雌ダニ抽出液とした．抽出時間は，100頭めのダニをヘキサンに浸漬して3分間とした．得られた抽出液をシリカゲル（500 mg, Wako-gel C-200, 和光純薬工業）に吸着させ，3 mL の溶出溶媒で段階的に溶出した．溶出溶媒はヘキサン／エーテル系で行い，ヘキサン，1%，5%，10%，20%，50%エー

テル含有ヘキサン及びエーテルを用いた。

## 化学分析

$^1\text{H-NMR}$  スペクトルは TMS を内部標準として日本電子 JNM-FX 90 Q (90 MHz) 核磁気共鳴吸収分析機で測定した。 $^{13}\text{C-NMR}$  スペクトルは  $\text{CDCl}_3$  を内部標準 ( $\delta = 77.0$ ) として、上述の機種で測定した。赤外線吸収スペクトルは島津製作所 IR-400 赤外線分光分析機で測定した。旋光度は日本分光 DIP-370 旋光計で測定した。ガスクロマトグラフ法による分析には HP-5 キャピラリーカラム (0.3 mm x 30 m, Hewlett-Packard) を用いたガスクロマトグラフ Hewlett-Packard 5790A で行い、得られたクロマトグラムは Hewlett-Packard Integrator model 3390A で処理した。マススペクトルはガスクロマトグラフ M-80 二重収束型高分解能質量分析計 (日立製作所製) を用い 70 eV のイオン化電圧で低分解能で測定した。

合成した epoxyneral の光学純度の測定はキラルな固定層を持つキャピラリーカラム (CP-cyclodextrin b-2, 3, 6-M-19 カラム, 25 m x 0.25 mm, Chrom-pack) を用いて 100℃ 及びスプリット比 (50:1) の条件で測定した。Epoxyalcohol や epoxybenzoate の光学純度は、それぞれを epoxyneral に誘導して、測定した値で示した。

## (2S, 3R)- 及び (2R, 3S)-Epoxyneral の合成

Titanium tetraisopropoxide (5.7 g, 20 mmol) を無水  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (200 mL) に加え、窒素気流下 -23℃ (ドライアイス/四塩化炭素) で攪拌した。更に (+)-diethyl tartrate (4.2 g, 20 mmol) をこれに加え、-23℃ で 5 分間攪拌した。無水  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  に溶解した nerol (3.1 g, 20 mmol), 続いて 3.0 M 無水 tert-butyl hydroperoxide のトルエン溶液を反応液に加えて、-23℃ で 20 時間反応させた。この反応溶液に 10% tartaric acid 溶液 (50 mL) を -23℃ で加え、反応を停止させた。さらに 30 分間 -23℃ で攪拌した後、この反応溶液を室温に戻して 2 時間攪拌した。有機層を分離し水洗した後、 $\text{Na}_2\text{SO}_4$  で乾燥して減圧

下に濃縮した。得られた油状物をエーテル (150 mL) で希釈し、氷冷下に 1 N sodium hydroxide (60 mL) 溶液を加え 30 分間攪拌した。エーテル層を分離し食塩水で洗った後、 $\text{Na}_2\text{SO}_4$  で乾燥して減圧下に濃縮して油状物を得た。油状物はシリカゲルカラムに吸着させヘキサン/エーテル系の溶媒で精製し溶出して (2*S*, 3*R*)-epoxynyerol (2.7 g, 収率 79.5%) を得た。  $[\alpha]_{\text{D}}^{14} = -14.4^\circ$  ( $c = 3.11$ , hexane); IR (film) :  $\nu = 3400 \text{ cm}^{-1}$  (br., O-H), 1440 (s, C-H), 1350 (s, C-H), 1240 (w, C-O of epoxide), 1050 (s, C-O);  $^1\text{H-NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ ) :  $\delta = 1.34$  (s, 3H), 1.62 (br.s, 3H), 1.70 (d, 3H,  $J = 1.1 \text{ Hz}$ ), 1.6-2.1 (m, 4H), 2.47 (m, 1H), 2.96 (dd, 1H,  $J = 4.8, 6.6 \text{ Hz}$ ), 3.73 (m, 2H), 5.09 (m, 1H);  $^{13}\text{C-NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ ) :  $\delta = 17.6, 22.2, 24.2, 25.6, 33.2, 61.3, 61.5, 64.4, 123.4, 132.5$ ; MS  $m/z$  155 ( $\text{M}^+ - \text{CH}_3$ , 1.0%), 152 ( $\text{M}^+ - \text{H}_2\text{O}$ , 2.3%), 109 (80.6%), 69 (80.5%), 41 (100%). 光学純度は 77 % ee であった。

(2*R*, 3*S*)-異性体は (-)- diethyl tartrate を用いて同様に合成し、2.5 g (収率 : 73.5%) を得た。  $[\alpha]_{\text{D}}^{14} = +14.5^\circ$  ( $c = 3.78$ , hexane); IR,  $^1\text{H-NMR}$ ,  $^{13}\text{C-NMR}$  及び MS スペクトルは (2*S*, 3*R*)-epoxynyerol と同じであった。また、光学純度も 77% ee であった。

#### (2*S*, 3*R*)- and (2*R*, 3*S*)-Epoxy-3, 7-dimethyl-6-octenyl 3, 5-dinitrobenzoate

(2*S*, 3*R*)-epoxynyerol (1.4 g, 7.6 mmol) を無水エーテル (30 mL) と無水ピリジン (3 mL) に溶解し、これに氷冷しながら 3, 5-dinitrobenzoyl chloride (2.5 g, 11 mmol) を加え 12 時間攪拌した。この混合液に氷水を加え反応を停止し、エーテルで抽出した。このエーテル層は飽和  $\text{CuSO}_4$  溶液、水及び食塩水で洗い、 $\text{Na}_2\text{SO}_4$  で乾燥して減圧下に濃縮した。得られた油状物を温ヘキサン/エーテル (5:1) に溶解し、繰り返し結晶化し、結晶性の (2*S*, 3*R*)-epoxy-3, 7-dimethyl-6-octenyl 3, 5-dinitro-benzoate (562 mg, 18.3% yield) を得た。一方、母液をシリカゲルカラムで精製し油状の (2*S*, 3*R*)-epoxy-3, 7-dimethyl-6-octenyl 3, 5-dinitrobenzoate (1.6 g, 54% yield) を得た。結晶性ベンゾエートの物理化学的データを以下に示す。  $[\alpha]_{\text{D}}^{27} = -14.0^\circ$  ( $c = 0.90$ ,

benzene); IR (film) :  $\nu = 3080 \text{ cm}^{-1}$  (m, Ar-H), 1730 (s, C=O), 1540 (s, N-O), 1340 (s, N-O), 1260 (s, C-O), 1150 (s, C-O) ;  $^1\text{H-NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ ) :  $\delta = 1.41$  (s, 3H), 1.64 (br.s, 3H), 1.70 (br.s, 3H), 1.6-2.3 (m, 4H), 3.17 (dd, 1H,  $J = 3.7, 7.4$  Hz), 4.36 (dd, 1H,  $J = 7.4, 12.1$  Hz), 4.76 (dd, 1H,  $J = 3.7, 12.1$  Hz), 5.13 (m, 1H), 9.20 (m, 3H);  $^{13}\text{C-NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ ) :  $\delta = 17.7, 22.0, 24.2, 25.7, 33.4, 60.5, 61.2, 65.8, 122.6, 123.0, 129.5, 132.8, 133.6, 148.9, 162.5, 198.8$ ; MS  $m/z$  364 ( $\text{M}^+$ , 1.0%), 346 ( $\text{M}^+ - \text{H}_2\text{O}$ , 5.2%), 239 (44.8%), 195 (100%), 149 (70.9%), 109 (77.1%). 光学純度は26% eeであった. 一方, 油状のベンゾエートの物理化学的データを以下に示す.  $[\alpha]_D^{30} = -52.1^\circ$  ( $c = 1.14$ , benzene). また, IR,  $^1\text{H-NMR}$ ,  $^{13}\text{C-NMR}$  及び MS の各スペクトルは結晶性ベンゾエートのデータと一致した. 油状ベンゾエートの光学純度は97% eeであった.

(2*R*, 3*S*)-異性体は, (2*R*, 3*S*)-epoxyneryl (77% ee) から同じ方法でエステル化し, 精製して結晶性ベンゾエート 374 mg (収率 13%) を得た. 結晶性ベンゾエートの物理化学的データを以下に示す.  $[\alpha]_D^{26} = +13.4^\circ$  ( $c = 0.90$ , benzene). 光学純度は24% eeであった. 一方, 母液由来の油状ベンゾエートも同様に精製し 1.4 g (収率 50%) 得た. 物理化学的データを以下に示す.  $[\alpha]_D^{28} = +52.6^\circ$  ( $c = 1.06$ , benzene). 光学純度は96% eeであった. また, IR,  $^1\text{H-NMR}$ ,  $^{13}\text{C-NMR}$  及び MS の各スペクトルは上に示したものと良く一致した.

#### (2*R*, 3*S*)-Epoxy-3, 7-dimethyl-6-octenyl 3, 5-dinitrobenzoate の加水分解

母液由来の (2*S*, 3*R*)-epoxy-3, 7-dimethyl-6-octenyl 3, 5-dinitrobenzoate をメタノール (10 mL) と THF (10 mL) の混液に溶解し, 氷冷下で  $\text{K}_2\text{CO}_3$  (60 mg) と30分間攪拌しながら加水分解させた. 得られた油状物はシリカゲルカラムで精製し, (2*S*, 3*R*)-epoxyneryl (収率 82%) を得た.  $[\alpha]_D^{27} = -18.1^\circ$  ( $c = 1.12$ , hexane). 光学純度は97% eeであった. IR,  $^1\text{H-NMR}$ ,  $^{13}\text{C-NMR}$  及び MS の各スペクトルは前に示したものと良く一致した.

母液由来の (2*R*, 3*S*)-異性体も同様な方法で精製し, 367 mg (84%) を得

た。物理化学データを以下に示す。  $[\alpha]_D^{27} = +17.2^\circ$  ( $c = 0.97$ , hexane). 光学純度は 96% ee であった。IR,  $^1\text{H-NMR}$ ,  $^{13}\text{C-NMR}$  及び MS の各スペクトルは前に示したものと良く一致した。

#### (2R, 3R)- and (2S, 3S)-Epoxyneral

(2S, 3R)-Epoxynerol (97% ee, 1.2 mmol) を無水  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (10 mL) に溶解し、氷冷下に pyridinium dichromate (PDC, 1 g) と 22 時間反応させた。反応混合物はシリカゲルカラムクロマトグラフィーで精製し、97% ee の光学純度を有する (2R, 3R)-epoxyneral (125 mg, 62%) を得た。(2R, 3R)-epoxyneral の物理化学的データを以下に示す。  $[\alpha]_D^{28} = +127.9^\circ$  ( $c = 1.12$ , hexane); IR (film)  $\nu = 2950\text{ cm}^{-1}$  (m, C-H), 2900 (m, C-H), 2850 (m, C-H), 1720 (s, C=O), 1450 (m, C-H), 1350 (m, C-H), 1240 (w, C-O of epoxide);  $^1\text{H-NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta = 1.42$  (s, 3H), 1.59 (br.s, 3H), 1.66 (br.s, 3H), 1.7-2.3 (m, 4H), 3.14 (d, 1H,  $J = 5.3$  Hz), 5.04 (m, 1H), 9.41 (d, 1H,  $J = 5.3$  Hz);  $^{13}\text{C-NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta = 17.6$ , 22.2, 24.2, 25.6, 33.5, 64.5, 64.6, 122.5, 133.3, 198.8; MS  $m/z$  153 ( $\text{M}^+ - \text{CH}_3$ , 0.9%), 150 ( $\text{M}^+ - \text{H}_2\text{O}$ , 1.5%), 109 (44%), 69 (78%), 41 (100%); Found: C, 71.10; H, 9.83. Calc for  $\text{C}_{10}\text{H}_{16}\text{O}_2$ : C, 71.40; H, 9.59. 光学純度は 97% ee であった。

(2S, 3S)-異性体も同様な方法で (2S, 3R)-epoxynerol (96% ee) から調製し、123 mg (収率 63%) を得た。物理化学的データを以下に示す。  $[\alpha]_D^{28} = -128.2^\circ$  ( $c = 0.89$ , hexane). 光学純度は 96% ee であった。IR,  $^1\text{H-NMR}$ ,  $^{13}\text{C-NMR}$  及び MS の各種スペクトルは (2R, 3R)-epoxyneral (97% ee) のものと一致した。

### 3-3 *Caloglyphus rodriguezi* の雌の性フェロモン

#### 3-3-1 雌雄の識別

*C. rodriguezi* 雄の配偶行動の観察は、2章で示した方法に加えて、パスツールピペットを用いる方法でも行った。パスツールピペット法の概要を図3-3-1に示す。本方法では条件付けした雄ダニ群の中へ雌ダニまたは雄ダニを一定方向から導入することが可能で、導入されたダニに対する条件付け雄ダニの行動を比較しやすい。しかしながら、本方法の欠点は検討したゴミコナダニ属ダニが必ずしも全て、ガラス壁面をうまく歩けないことにあった。今回用いた4種のゴミコナダニの中でも比較的自由にガラス壁面を歩けたのは *C. rodriguezi* のみで、他の3種では、本法による配偶行動の観察はできなかった。

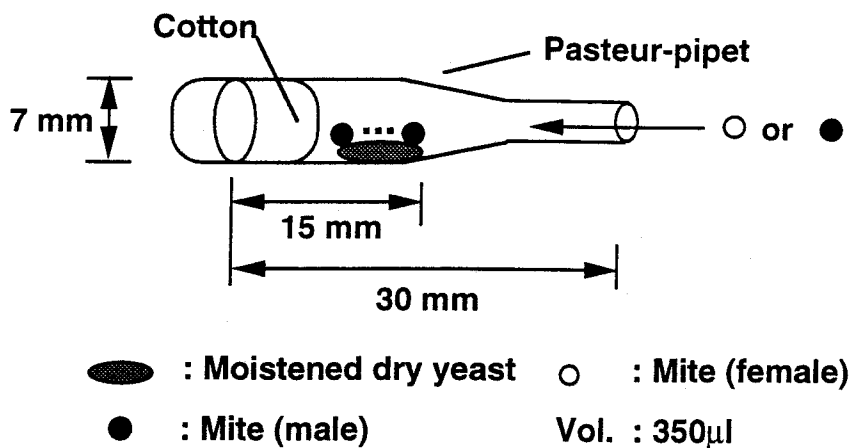


図3-3-1 パスツールピペット法による配偶行動の観察

条件付けした雄群に雌を導入した場合に導入雌が雄にマウントされる迄の時間と、雄群に雄を導入した場合の導入雄が他の雄とマウントするか（される）までの時間を計った。得られた結果を表3-3-1に示す。雌を導入した場合には平均151秒でマウントされるのに対して、雄を導入した場合にはマウントされるかマウントする迄の時間は平均492秒以上であった。更に、それぞれの実験例10例の中で雌を導入した時にマウント迄の時間が最も遅いのは296秒であるが、これは雄導入時に最も早くマウントに至った



時間（315秒）よりも早かった。また、雌雄間でマウントに至るまでの時間を検定すると、有意に雌の方が早くマウントされた（Mann-Whitney *U* test,  $P < 0.01$ ,  $n = 20$ ）。この時、条件付けした雄ダニの行動を見ると、ピペットのキャピラリー側から雌が導入された場合、明らかに雄は雌の方へ近寄って行った。これに対して雄が導入された場合には、条件付けされた雄は雌導入時に見られたような方向性を示さなかった。また、雌の近傍にいる雄は行動が活発化し雌の後を追ったり、雄同士でのマウント行動も見られた。

表3-3-1 雌または雄の導入でマウント行動が認められる迄に要した時間

Exp. No.	Male to Males	Female to Males
1	315sec	35sec
2	405	53
3	421	60
4	457	74
5	461	166
6	491	171
7	566	211
8	>600	220
9	>600	224
10	>600	296
Ave.	>492	151

### 3-3-2 雌の性フェロモンの構造決定と生物活性

次にこのパスツールピペットを用いて、ダニのヘキサン抽出物の生物試験を行った。生物試験の概要を図3-3-2に示す。この実験系ではダニの代わりに先端を球状にしたガラス棒をキャピラリー側から導入し、雄の行動を観察する方法を採用した。培地を除いたダニのヘキサン抽出物を与えたところ、球状の先端近傍の雄の行動が活性化して、雄が他の雄の後を追いかけた。雄同士のマウント行動が観察できる。この行動の活性化は、 $0.84 \mu\text{g}$  ダニ当量で認められた。

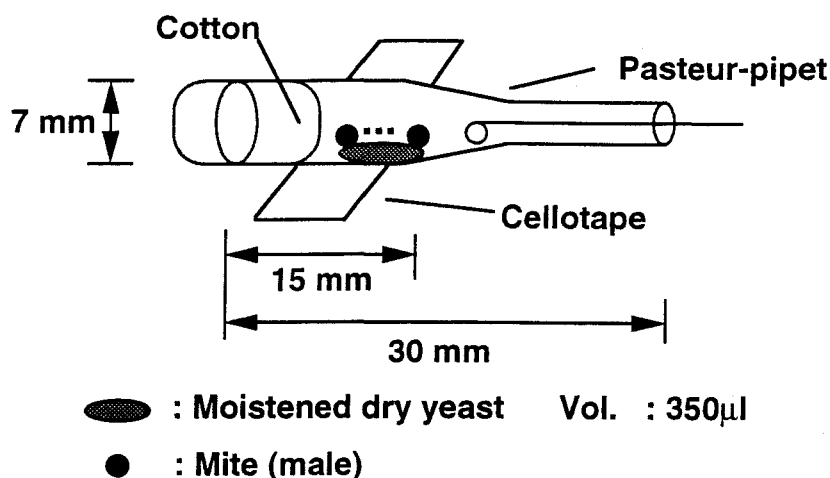


図 3-3-2 パスツールピペットを用いた生物試験法

以上の結果から、ダニのヘキサン抽出物が雄のマウント行動を活性化したことになる。ダニのヘキサン抽出物をガスクロマトグラフ法により分析した。結果を図 3-3-3 に示す。また、ダニ（湿重量 8.4 g）のヘキサン抽出物をシリカゲルカラムクロマトグラフィーで分画した。得られたフラクションの生物試験結果を図 3-3-4 に示す。ピーク 1（保持時間：5.29 分）は 5 % エーテル含有ヘキサン画分に溶出した。ガスクロマトグラム-質量分析計で分析すると、ピーク 1 は  $M^+$  イオンを  $m/z$  152 (3%) , 基準ピークを  $m/z$  43 (100%) に与え、その他の開裂イオンとして  $m/z$  124 (17%) , 109 (88%) , 94 (14%) , 79 (67%) 及び 77 (32%) を与えた。ピーク 1 の質量スペクトルは同種のダニから既に新規成分として同定されている dehydrocineole と推定された (Ayorinde et al., 1984) 。ピーク 2（保持時間：7.28 分）はヘキサン画分に溶出し、 $M^+$  イオンを  $m/z$  156 (0.11%) に、基準ピークを 57 (100%) に与え、その他の開裂イオンを  $m/z$  85 (4.4%) , 71 (10.1%) 及び 43 (19.6%) に与えた。標品の保持時間と開裂様式の比較から、ピーク 2 は undecane と同定できた。

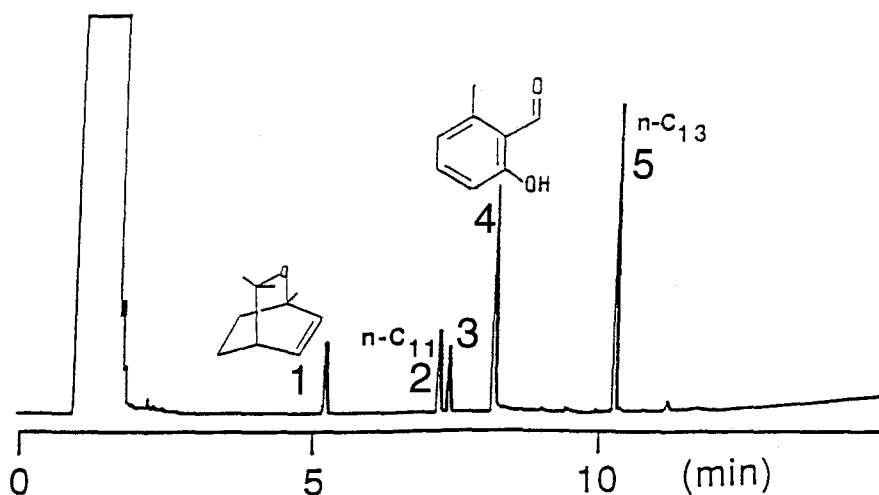


図3-3-3 *C. rodriguezi* ヘキサン抽出物のガスクロマトグラム

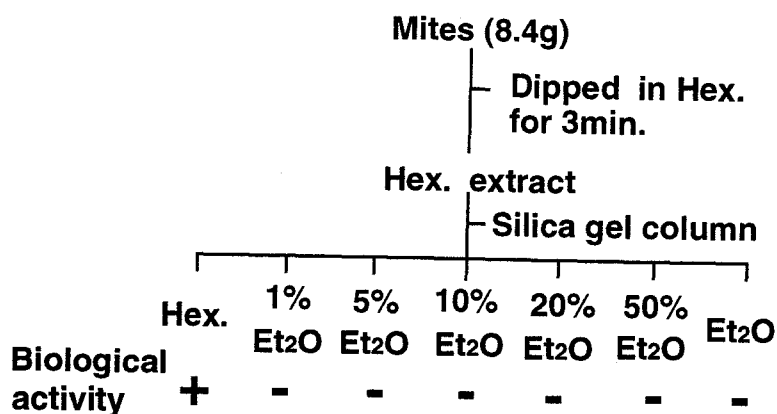


図3-3-4 *C. rodriguezi* ヘキサン抽出物の分画と活性の所在

ピーク3（保持時間：7.43分）は10% 及び50% エーテル含有ヘキサン画分に認められ、少なくとも2成分がガスクロマトグラフ法で同一の保持時間を示すと考えられた。これらの成分を分画してそれぞれの質量スペクトルを測定したところ、得られたスペクトルは非常に類似していた。M<sup>+</sup>イオンは m/z

150 (84%) に、基準イオンは  $m/z$  135 (100%) に認められ、その他の開裂イオンとして  $m/z$  91 (60%), 79 (66%), 67 (64%), 41 (96%) 及び 39 (97%) を認めた。これらの化合物の構造については、現在検討中である。ピーク 4 (保持時間: 8.22分) は 5% エーテル含有ヘキサン画分に溶出し、 $M^+$  イオン及び基準イオンとして  $m/z$  136 (100%) を、その他の開裂イオンとして  $m/z$  135 (98%), 107 (4.6%), 90 (8.1%) 及び 77 (9.2%) を与えた。ガスクロマトグラフ法の保持時間と開裂様式を比較した結果、ピーク 4 は 2-hydroxy-6-methylbenzaldehyde と同定できた。ピーク 5 (保持時間: 10.35分) はヘキサン画分に溶出し、 $M^+$  イオンを  $m/z$  184 (0.17%) に、基準イオンを  $m/z$  57 (100%) に与え、その他の開裂イオンを  $m/z$  127 (0.3%), 85 (8.9%), 71 (14.7%) 及び 43 (15.7%) に与えた。標品との比較から、ピーク 5 は tridecane と同定できた。

ダニのヘキサン抽出物は 0.84  $\mu$ g ダニ当量で雄のマウント行動を解発した。そこで、得られた各フラクション 0.84  $\mu$ g ダニ当量を雄ダニにパスツールピペット生物試験法で与えたところ、ヘキサン溶出部にのみ活性を認め、他の画分はいずれも不活性であった。上述したように、この活性画分には undecane (保持時間: 7.28分) と tridecane (保持時間: 10.35分) が検出できる。フェロモン本体の同定と関連化合物のフェロモン活性を調べるために、nonane から tetradecane に至る炭化水素 6 種について、性フェロモン活性を調べた。活性の強さは、(反応した雄ダニ数/全雄ダニ数) のパーセントで表示した。得られた結果を表 3-3-2 にまとめる。ヘキサン処理したコントロールでは活性の強さは 13% - 26% であった。活性画分に含まれていた undecane と tridecane のうち、undecane は 1 ng と 10 ng で活性を示し、それぞれ 44% ( $\chi^2$  独立性の検定法,  $P < 0.01$ ) と 42% ( $P < 0.01$ ) となり、コントロールと比較して有意に雄のマウント行動を活発化した。

表3-3-2 6種の炭化水素が示す雄ダニマウント活性の比較

Compound and Dose		n <sup>a</sup>	Control		Test		Significance
			+ <sup>b</sup> / <sub>-</sub> <sup>c</sup> (% <sup>d</sup> )		+ <sup>b</sup> / <sub>-</sub> <sup>c</sup> (% <sup>d</sup> )		
1ng	C <sub>9</sub>	3	12/78	(13%)	10/80	(11%)	n.s.
	C <sub>10</sub>	5	26/124	(17%)	59/91	(39%)	<i>P</i> < 0.01
	C <sub>11</sub>	6	30/150	(17%)	79/101	(44%)	<i>P</i> < 0.01
	C <sub>12</sub>	5	26/124	(17%)	65/85	(43%)	<i>P</i> < 0.01
	C <sub>13</sub>	3	13/77	(14%)	10/80	(11%)	n.s.
	C <sub>14</sub>	3	14/76	(16%)	13/77	(14%)	n.s.
10ng	C <sub>9</sub>	3	16/74	(18%)	13/77	(14%)	n.s.
	C <sub>10</sub>	5	27/123	(18%)	50/100	(33%)	<i>P</i> < 0.01
	C <sub>11</sub>	6	29/151	(16%)	76/104	(42%)	<i>P</i> < 0.01
	C <sub>12</sub>	3	15/75	(17%)	37/53	(41%)	<i>P</i> < 0.01
	C <sub>13</sub>	3	16/74	(18%)	12/78	(13%)	n.s.
	C <sub>14</sub>	3	16/74	(18%)	11/79	(12%)	n.s.
100ng	C <sub>9</sub>	3	16/74	(18%)	20/70	(22%)	n.s.
	C <sub>10</sub>	4	31/89	(26%)	49/71	(41%)	<i>P</i> < 0.05
	C <sub>11</sub>	4	21/99	(18%)	0/120	(0%)	<i>P</i> < 0.01
	C <sub>12</sub>	5	35/115	(23%)	59/91	(39%)	<i>P</i> < 0.01
	C <sub>13</sub>	3	16/74	(18%)	17/73	(19%)	n.s.
	C <sub>14</sub>	3	16/74	(18%)	22/68	(24%)	n.s.

n.s.: not significant.

<sup>a</sup> Number of replications.

<sup>b</sup> Total number of responsive males.

<sup>c</sup> Number of mites showing negative response.

<sup>d</sup> Responsive mites/total mites.

一方, tridecane は 1 ng, 10 ng 及び 100 ng でそれぞれ 11%, 13% 及び 19% の活性の強さを示し, 生物試験を行った全ての濃度範囲でコントロールとの間に有意差を認められなかった. Undecane を 1 ng 及び 10 ng 雄ダニに与えると, ガラス棒先端の近傍で雄同士が後を追い, お互いにマウントしようとする性行動が頻繁に認められた. その結果, マウント行動の頻度が上がった. その他の炭化水素では decane 1 ng (39%,  $P < 0.01$ ), 10 ng (33%,  $P < 0.01$ ) 及び 100 ng (41%,  $P < 0.05$ ) でコントロールに比べて有意にマウント行動の頻度が上がった. 同じように, dodecane 1 ng (43%,  $P < 0.01$ ), 10ng (41%,  $P < 0.01$ ) 及び 100 ng (39 %,  $P < 0.01$ ) でも有意差が認められた. それに対して, nonane や tetradecane は tridecane と同様にいずれの濃度でも雄のマウント行動を活発化しなかった. 一方, undecane を 100 ng 与えた場合には, 静止して摂食中の雄も分散し出すなど, 殆ど全ての雄がガラス棒の先端から逃げるような行動を示した. 雄が逃げる際には, マウント行動等の性的な行動は認められなかった. この様に通常認められない逃避行動は雄だけではなく, 雌や若虫にも観察できた. また一方, 活性な量である 1 ng 及び 10 ng の undecane を雌や若虫に与えても, 何ら特異な行動は認められなかった.

ヘキサン抽出物の 0.84  $\mu$ g ダニ当量が雄ダニのマウント行動を解発したので, 0.84  $\mu$ g ダニ当量中の undecane 量を調べたところ約 1 ng と定量できた. 従って表 3-3-2 の結果と併せて, ヘキサン溶出部の活性は undecane により解発されたと考えた.

標品の undecane を用いた雄ダニのマウント活性について, 定量的な評価の結果を図 3-3-5 に示した. それぞれの濃度において 2 分間で観察できる雄同士のマウント回数をコントロールと比較した. 与えたフェロモン量が増すにつれてマウント回数も増加し, 1 ng と 10 ng で最も強い活性が認められたが (Kruskal-Wallis, 共に  $P < 0.05$ ), 100 ng では雄は逃避行動を示しマウント行動は観察されなかった (Kruskal-Wallis,  $P < 0.01$ ). 従って, 図 3-3-5 に示したように投与したフェロモン量とマウント回数との関係は極大

値を持つ凸の曲線となった。

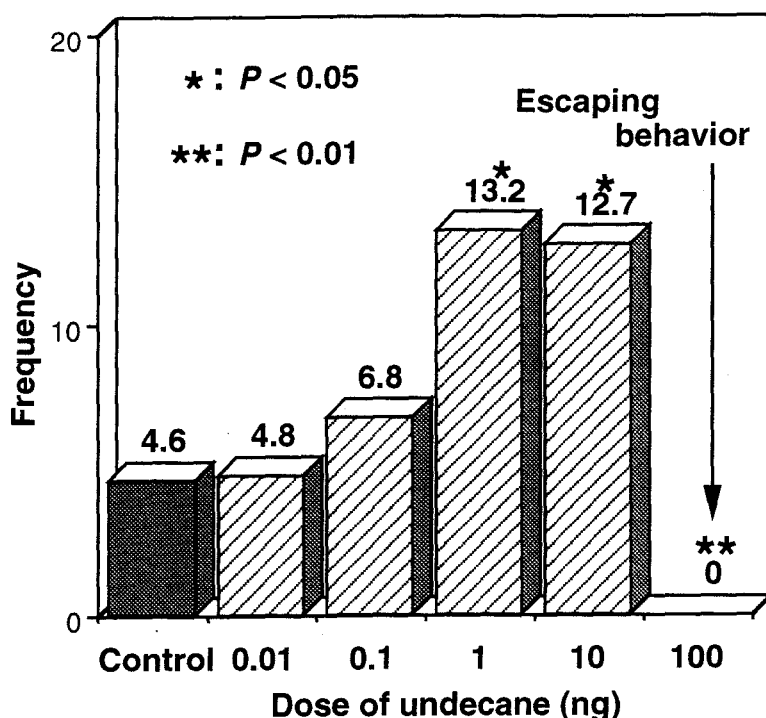


図3-3-5 雄ダニマウント活性の定量的評価

### 3-3-3 雌の性フェロモンの分布様式

雄のマウント行動を解発する雌の性フェロモン undecane の存在を雌、雄及び第1若虫で調べた。結果を図3-3-6に示す。3-2に示したコフキコガネ由来のゴミコナダニ *Caloglyphus* sp. 1 と同じように、雌の性フェロモンは雌ばかりではなく雄にも主要成分として検出できた。一方、第1若虫のヘキサン抽出物中には痕跡程度にしかundecaneは含まれていなかった。従って、*C. rodriguezi* では雌の性フェロモンは成虫特異的であると結論した。雌雄における undecane の含有量は、雌では  $22.7 \pm 3.8$  ng (平均値  $\pm$  SE)、雄では  $3.6 \pm 0.8$  ng (平均値  $\pm$  SE) と、雌は雄の6.3倍多く、また、雌雄それぞれの個体間での雌の性フェロモンの含有量の分布は、図3-3-7に示したように有意差が認められた (Mann-Whitney *U* test,  $P < 0.001$ ,  $n = 40$ )。

また、その他の成分では 2-hydroxy-6-methylbenzaldehyde (2,6-HMBD) が雌、雄及び第 1 若虫のいずれにおいても最も多く含まれる成分であった。成虫では、続いて雌の性フェロモン undecane , そして tridecane となる。第 1 若虫では 2,6-HMBD に続いて tridecane が 2 番目に多く含まれていた。

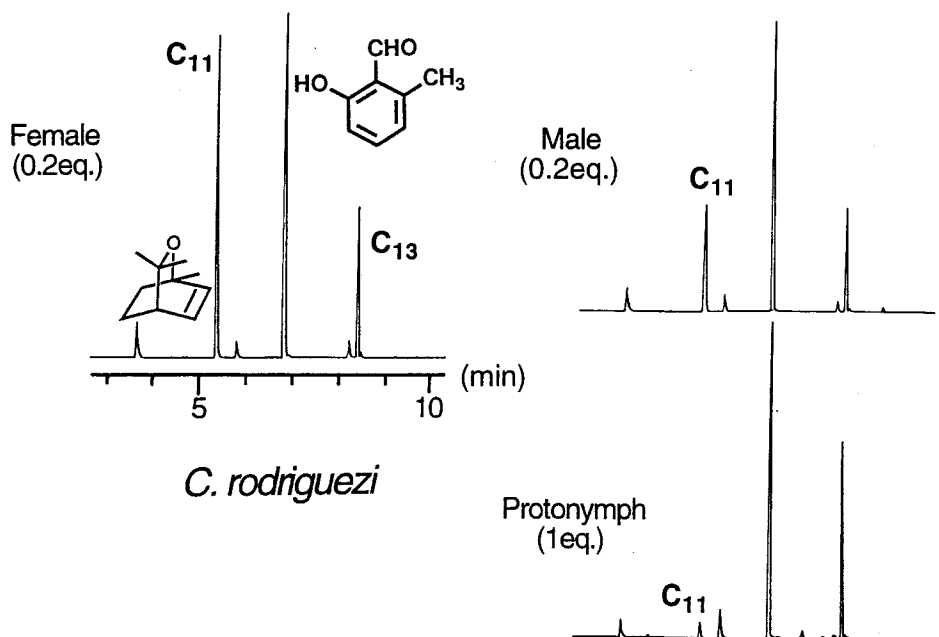


図 3-3-6 雌、雄及び第 1 若虫のヘキサン抽出物のガスクロマトグラム



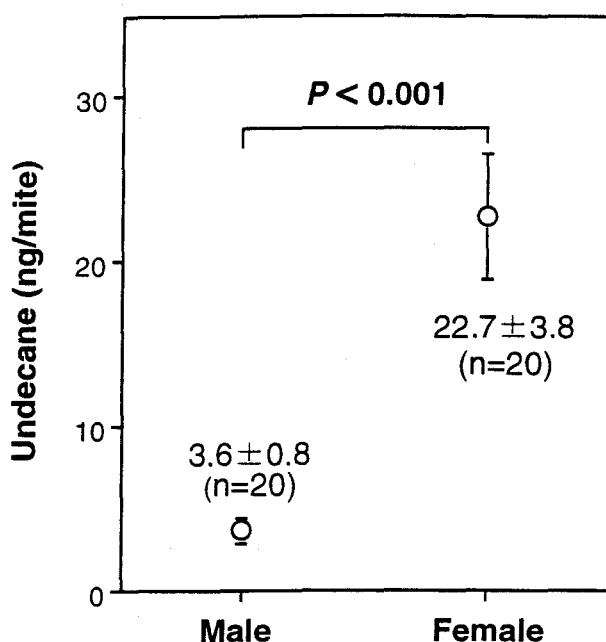


図3-3-7 雌雄間における雌の性フェロモンの含有量の比較

#### 3-3-4 考察

コナダニの後胴体部腺分泌物の成分が種特異的であり，そのガスクロマトグラムのプロフィールが，コナダニ類の化学分類に利用されている (Kuwahara et al., 1989; Leal et al., 1989b; Kuwahara, 1991; Leal and Kuwahara, 1991) . Ayorinde らは (1984) undecane, 2,6-HMBD, tridecane 及び dehydrocineole をそれぞれ 6 : 4 : 9 : 2 の比率で *C. rodriguezi* Samsinak から同定しているが，化合物の生物的な機能については言及していない．本実験で用いたコナダニからこれらの化合物 4 種類の他に，M<sup>+</sup>イオンが 150 と思われる少なくとも 2 種の未同定微量成分を検出した．この点を無視すると，後胴体部腺成分の化学的組成は Ayorinde らの報告と一致する．

本種のゴミコナダニ属ダニは形態的特徴から *C. rodriguezi* Samsinak と考えられたが，Samsinak の報告とは幾つかの矛盾点が認められている．Samsinak によると *C. rodriguezi* にはヒポプスが産生せず，その雄には 1 種

のタイプ (bimorphic form) しか認められない, と報告されている (Samsinak, 1980). しかし, 本種のコナダニからは飼育条件の悪化と共に, 少ないながらもヒポプスが発生する. また, 雄にもまれではあるが heteromorphic form が観察される (Kuroasa, unpublished). この様に, Samsinak の報告と本種のコナダニの観察結果には相違点はあるものの, bimorphic form の雄や雌の形態的な特徴はオリジナルの記述と非常に良く一致した. 以上の結果, Ayorinde らの報告と併せて, 化学分類学的な観点からもゴミコナダニ属コナダニは *C. rodriguezi* Samsinak と同定した.

パスツールピペットを用いた生物試験では, undecane を塗布したガラス棒の先端に雄は僅かながら誘引された様にも見受けられたが, 定量的な誘引活性の評価はできなかった. 3-2 に従いミニシャーレに内に雄ダニを条件付けし, undecane を染み込ませた濾紙を導入する方法でも, 定量的な誘引活性の評価はできなかったが, 0.5 ng で雄ダニは濾紙に執着し 2 章で述べたタッピング行動も認められた. 従って, undecane の誘引活性は定性的に確認できたと考えた. また, パスツールピペットを用いた生物試験法で, ガラス棒に undecane を 1 ng または 10 ng 塗布し雄ダニに与えると, 雄のマウント行動が活発化した. 従って, *C. rodriguezi* の雌性フェロモンは, undecane であり, 雄ダニの誘引活性とマウント行動発達の二つの機能を持っていると考えられる. また, 表の 3-3-2 にあるように, コントロールの場合でも雄同士で 13 - 26% の割合でマウント行動が認められるのは, 雄も雌性フェロモンを有しているためと考えられる. 3-2-4 で述べたように, 雌雄共に雌性フェロモンを持つことは, 現在までに雌性フェロモンが同定されたコナダニ類で, いずれも共通した事実である.

また, undecane の用量と雄のマウント回数の関係は凸の曲線になった. これはアシプトコナダニ *Acarus siro* (Levinson et al., 1989), オソアシプトコナダニ *Acarus immobilis* (Sato et al., 1993) 及び 3-2 に示した *Caloglyphus* sp. 1 に共通して認められており, コナダニ類の雌性フェロモンの特徴であると思われる. 更に, オソアシプトコナダニでは雌の性フェロモ

ンである 2,6-HMBD を高濃度 (1  $\mu$ g) に与えた場合に、雄ばかりではなく雌や若虫が逃避行動を示すことが報告されており (Sato et al., 1993), undecane を高濃度で与えた時の *C. rodriguezi* が示した反応と同様であった。1つの化合物が異なる機能を示す例は、昆虫のフェロモンで幾つか知られている。例えば、アリの 1 種 *Formica lugubris* (Hymenoptera: Formicidae) では、undecane が低濃度では性フェロモンとして、高濃度ではワーカーにとって警報フェロモンとして機能している (Walter et al., 1993)。また、ナガメ *Eurydema rugosa* の幼虫では (E)-2-hexenal が高濃度では警報フェロモン (Ishiwatari, 1974)、低濃度では集合フェロモンとして機能している (Ishiwatari, 1976)。ミナミアオカメムシ *Nezara viridula* の一令幼虫でも同じように、tridecane が高濃度では警報フェロモン、低濃度では集合フェロモンとして機能している (Lockwood and Story, 1985)。以上のように昆虫では例があるが、現在までに警報フェロモンが同定されているコナダニ類との比較と判断から、高濃度の undecane が *C. rodriguezi* において警報フェロモンとしても機能しているとは、著者は考えていない。例えば、neryl formate が警報フェロモンとして同定されているケナガコナダニ *Tyrophagus putrescentiae* では、コロニー中で 1 個体または数個体を押しつぶすと、回りのダニが逃げ出す現象が観察されている (Kuwahara et al., 1975)。それに対して同様にコロニー中で *C. rodriguezi* 1 個体を押しつぶしても、回りのダニの逃避行動は認められない。また、1 頭当たりの undecane の含量が雌で 22.7 ng, 雄が 3.6 ng なのに対して、逃避行動が解発されるには 100 ng 必要であった。以上の事実から、現在のところ undecane は性フェロモンであるが、警報フェロモンとしても機能しているとは考えていない。しかし、コナダニ類の雌の性フェロモンが高濃度で逃避行動を解発するのは、オソアシブトコナダニ (Sato et al., 1993) と *C. rodriguezi* の 2 種で認められている以上、何らかの生態的意味をもつ可能性は否定できない。コナダニ類の雌の性フェロモンの共通した特徴である可能性も考えられる。この観点からも、今後の研究が必要であろう。

一般にフェロモン活性の強さは、被検生物の条件付けや生物試験の装置等に大きく依存するが、今までのコナダニ類の雌の性フェロモンの生物試験結果からは、その活性は非常に弱く、近距離でのみ有効であろうと考えられていた。例えば、*C. polyphyllae* では活性発現には 0.5 - 5 雌当量が必要であり (Leal et al., 1989a) , ムギコナダニ *Aleuroglyphus ovatus* (Kuwahara et al., 1992) とオソアシブトコナダニ *Acarus immobilis* (Sato et al., 1993) ではそれぞれ 45-95 雌当量及び 35 雌当量であった。これに対して、本実験では雌のフェロモン活性は 1 ng で認められ、雌の含有量から  $9.0 \times 10^{-2}$  -  $5.4 \times 10^{-2}$  雌当量に相当した。これはコナダニ類で初めて 1 雌当量以下で性フェロモン活性が認められる例となった。これは、ムギコナダニやオソアシブトコナダニで用いられた生物試験容器をパスツールピペットに改良し、体積を 7/80 にスケールダウンした結果と考えられる。当然のことではあるが、体長 1 mm 程度のダニを対象にした生物試験は、できる限り小容量の試験容器を工夫すべきであろう。今回用いたパスツールピペット法はこの意味で効果を発揮したが、3-3-1 に書いたように他のゴミコナダニ 3 種はピペット内側のガラス壁面を歩けず、汎用性に欠けたものであった。

Undecane は非常に単純で安定な化合物であるが、情報化学物質として幾種かの昆虫に利用されている。上述したようにアリの 1 種 *Formica lugubris* (Hymenoptera: Formicidae) では、undecane が低濃度では性フェロモンとして、高濃度ではワーカーにとって警報フェロモンとして機能している (Walter et al., 1993) 。また、ゴキブリの 1 種 *Blaberus craniifer* は undecane を集合フェロモンとして利用している (Broussut et al., 1974) 。その他にも、鋏角類メクラグモ目の 1 種や半翅目のミナミアオカメムシ、甲虫目の多数種及び膜翅目の多数種で undecane が防御物質として利用されている (Blum, 1981) 。

### 3-3-5 実験の部

#### ダニ

本実験で用いた *Caloglyphus rodriguezi* の由来と飼育方法は 2-4 に示した。本種のゴミコナダニ属ダニ同定は、黒佐の報告に詳しい (Kurosa, unpublished)。

### 生物試験方法

生物試験容器は桑原ら (1992) によって報告されたものを改良した。パスツールピペット (外径: 7 mm, 長さ: 140 mm, Iwaki-Glass) を長さ 40 mm, キャピラリー部の長さ 20 mm になるように両端を切り, これを生物試験容器とした。改良後の生物試験容器の体積は約 250  $\mu$ l となり, 改良前の体積の約 7/80 となった。そこに乾燥酵母を水で粘土状とした飼料を入れ, 30 頭の雄ダニまたは雌ダニを導入した。更に, 水を染み込ませた綿球を入れて, ダニが逃げ出さないように生物試験容器の両端を綿で栓をした。また, セロテープを用いて生物試験容器が転がらないようにも工夫した (図 3-3-2 参照)。ダニを導入して約 1 時間条件付けした後, 以下の 2 つの生物試験を行った。なお, 生物試験は全てハロゲンランプ (6 V-10 W) 照射しながら, 実体顕微鏡で観察・評価した。

生物試験 (1) は本種の雄ダニがマウントする対象として雌雄を識別できるか否かについて検討した。条件付けした雄ダニに, 生物試験容器のキャピラリー側から雌又は雄を 1 頭ずつ導入した。雌を導入した場合は雌が条件付けした雄ダニにマウントされるまでの時間を, 一方, 雄を導入した場合は導入雄が条件付け雄にマウントするまたはマウントされるまでの時間を計った。この実験は雄または雌の導入をそれぞれ 10 回行い, 得られた結果を Mann-Whitney *U* test で有意差の検定を行った。

生物試験 (2) はフェロモン活性を定量的に評価するために行った。ガラス棒 (外径: 1 mm, 長さ: 100 mm) の先端に一定濃度の試験化合物を塗布し, キャピラリー側から静かに生物試験容器中に導入した。サンプルを導入後, 雄ダニの間で認められるマウント行動の頻度を 2 分間観察・計測した。得られた生物試験の結果は,  $\chi^2$  独立性の検定法及び Kruskal-Wallis 法と

Dann の方法を組み合わせた多重比較により行った（高木正見，1985）．また， $\chi^2$  独立性の検定法では，反応しなかった雄ダニの個体数は（雄ダニ総数－反応した雄ダニの個体数）で算出した．この生物試験法は室温下で 3-6 回繰り返して行った．

### 抽出方法

ダニのフェロモンの大量抽出は次のように行った．全生育ステージを含むダニを飽和食塩浮遊法（Matsumoto, 1965）で培地から分離し，得られたダニ虫体（8.4 g）を 3 分間ヘキサンに浸漬した後，濾別によりヘキサン抽出液を得た．このヘキサン抽出液は減圧下に濃縮し，シリカゲルカラム（500 mg, Wako-gel C-200, 和光純薬工業）に吸着させた後，それぞれ 3 mL の溶出溶媒で段階的に溶出し分画した．溶出溶媒はヘキサン／エーテル系で行い，ヘキサン，1%，5%，10%，20%，50% エーテル含有ヘキサン及びエーテルを用いた．

フェロモンの定量は以下のように行った．底を紡錘形にしたガラス製チューブ（外径：8 mm，高さ：30 mm，手製）に内部標準として tetradecane（10 ng / $\mu$ L）を含むヘキサン（5  $\mu$ L）を入れ，交尾の経験を問わない 1 頭の雌ダニを枝付バリで入れた．ダニをヘキサンに加えてから 3 分後，ヘキサン抽出物の 1  $\mu$ L（0.2 当量）をガスクロマトグラフ法で分析した．雄ダニも雌と同じように処理した．一方，第 1 若虫は 5 頭を 5  $\mu$ L のヘキサンで抽出し，1  $\mu$ L（1 当量）をガスクロマトグラフ法で分析した．実験より得られた undecane / tetradecane のピーク比を予め作製した合成した undecane と tetradecane の検量線（ $r^2 = 0.999$ ）に代入して，ダニ虫体から抽出された undecane 量を算出した．このフェロモンの定量のため，サンプル数は雄・雌共に 20 頭ずつ計 40 頭を用いた．雌雄間でのフェロモン含量の分布の統計学的な有意差は，ノンパラメトリックな独立 2 群間の検定に用いられる Mann-Whitney *U* test (Stat View II) により検定した．

## 化学分析

ガスクロマトグラフ法による分析は水素炎イオン検出器を装着した Hewlett-Packard 5790A 及び 5890 series II *plus* に HP-1（内径：0.2 mm, 長さ：25 m, 膜厚：0.25  $\mu$ m, Hewlett-Packard）または HP-5（内径：0.32 mm, 長さ：30 m, 膜厚：0.33  $\mu$ m, Hewlett-Packard）キャピラリーカラムを用い、スプリットレスモードで行った。キャリアーガスはヘリウムを使用し、50 mL/min で流した。オープン温度は2分間 60  $^{\circ}$ C に保った後、10  $^{\circ}$ C/分で 290  $^{\circ}$ C まで昇温した。また、注入口と検出器の温度はそれぞれ 200  $^{\circ}$ C 及び 280  $^{\circ}$ C である。得られたクロマトグラムは HP Integrator model 3390A 及び HP 3396 series II Integrator（いずれも Hewlett-Packard）で処理した。マススペクトルは日立製作所製のガスクロマトグラフ M-80 二重収束型高分解能質量分析計を用い、70 eV のイオン化電圧で低分解能モードで測定した。尚、用いたキャピラリーカラムは HP-1 で、上述と同様の条件で運転した。

### 3-4 *Caloglyphus* sp. 2 の雌の性フェロモン

#### 3-4-1 雌の性フェロモンの構造決定と生物活性

本種の雌ダニヘキササン抽出物を用いた生物試験の方法を図3-4-1に示した。本生物試験では、雄ダニのタッピング行動とマウント行動の活発化を指標とした。なお、生物試験法の詳細は「実験の部」に示した。

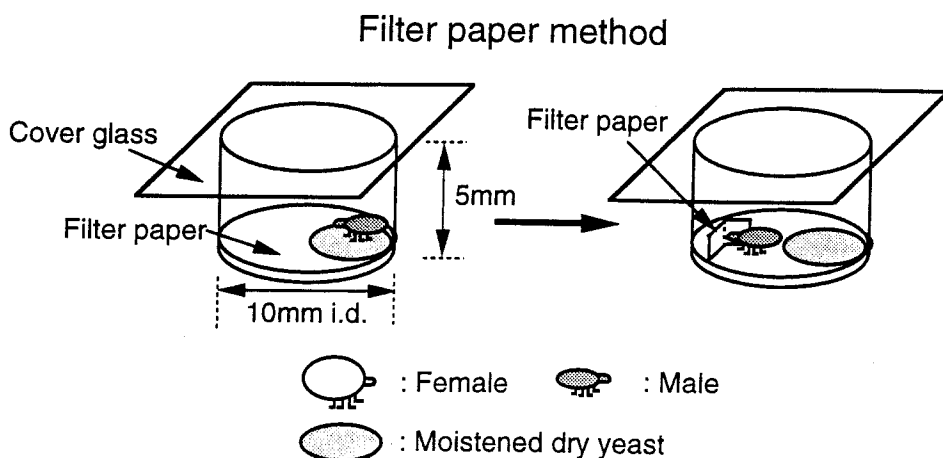


図 3-4-1 *Caloglyphus* sp. 2 の雌の性フェロモン検定に用いた生物試験法

ミニシャーレ内にコントロールとしてヘキササンを塗布した濾紙を入れた場合と雌ダニのヘキササン抽出物の一定量を入れた場合で、サンプル導入後から2分間に観察される雄ダニ間で起こるマウント回数を数えた。その結果、コントロールでは2分間に観察される雄ダニ間のマウント回数は平均3.6回 ( $n=10$ ) であるのに対して、0.2当量の雌ダニヘキササン抽出物をサンプルとして導入するとそのマウント回数は平均6.3回 ( $n=10$ ) となった(図3-4-2)。コントロールと比較した結果、0.2当量の雌ダニヘキササン抽出物では有意にマウント回数が増えたと結論できた(Mann-Whitney  $U$  test,  $P < 0.01$ ,  $n=20$ )。また、濾紙に執着する雄個体が多数認められたり、その雄ダニには濾紙にタッピングする行動が認められた。*Caloglyphus* sp. 1と同様に安定して誘引活性を認めることはできなかったが、本種の雌ダニのヘキササン抽出



物が雄ダニに誘引活性を示すことを，定性的に確認した．本種のダニでも，誘引活性がばらつく原因は不明である．

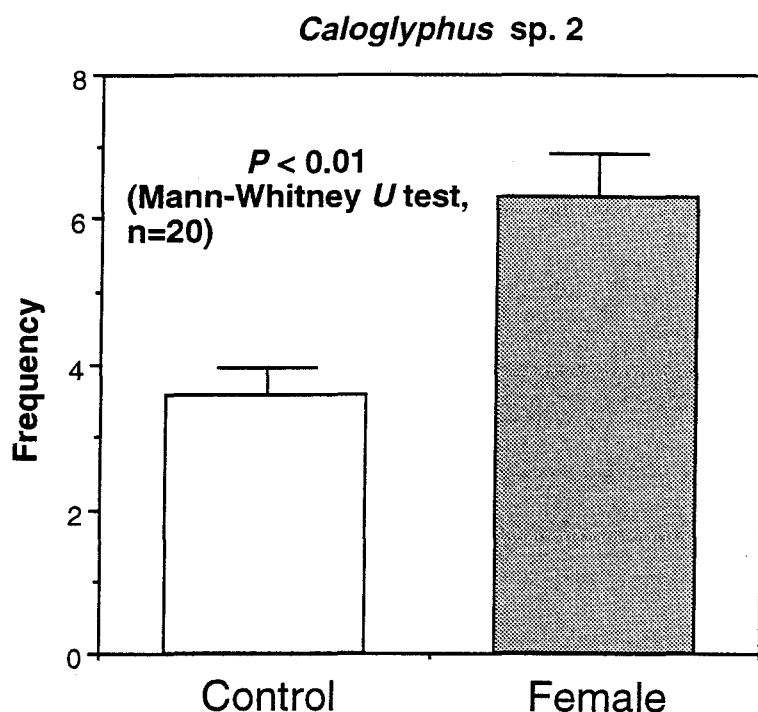


図 3-4-2    コントロールと雌ダニヘキサン抽出物の雄ダニ  
マウント回数に及ぼす影響

雄ダニのマウント行動を活発化する雌のヘキサン抽出物のガスクロマトグラムを図 3-4-3 に示した．ヘキサン抽出物中にはピーク 1（保持時間：5.80 分）とピーク 2（保持時間：14.8 分）の 2 成分が認められた．また，雌ダニ 50 頭のヘキサン抽出物をシルカゲルカラムに吸着させヘキサン／エーテルの混合液で段階的に溶出し，各フラクションを生物試験して調べた結果，ヘキサン溶出部にのみが 0.2 雌当量で雄ダニのマウント行動を活発化する活性を示した（図 3-4-4）．ヘキサン溶出部はガスクロマトグラフ分析でピーク 1 の単一成分を与えた．ピーク 1 をガスクロマトグラフ-質量分析計で分析した結果，基準イオン及び同時に  $M^+$  イオンでもあるイオンを  $m/z$  150 (100%) に与え，その他の開裂イオンとして  $m/z$  135 (99.9%), 107 (63.7

%), 95 (70.2%), 91 (75.4%), 82 (47.8%), 79 (63.9%), 65 (26.0%), 41 (70.7%)  
 及び 39 (60.7%) を与えた。得られた質量スペクトルを図 3-4-5 に示す。  
 これは、コナダニ亜科に属するオンシツケナガコナダニ *Tyrophagus*  
*neiswandari* (Leal et al., 1989b), オソアシブトコナダニ *Acarus immbolis*  
 (unpublished), 及びネダニ亜科に属するロビンネダニ *Rhizoglyphus robini*  
 (unpublished) から体表成分として同定されている rosefuran のそれと同一の  
 質量スペクトルであり、またガスクロマトグラムの保持時間が一致した。一  
 方、ピーク 2 は 10 % エーテル含有ヘキサン溶出部に認められた。しかしな  
 がら、その質量スペクトルだけでは構造の推定に至るまでの情報を得るこ  
 とができなかった。ピーク 2 の化学構造については現在検討中である。

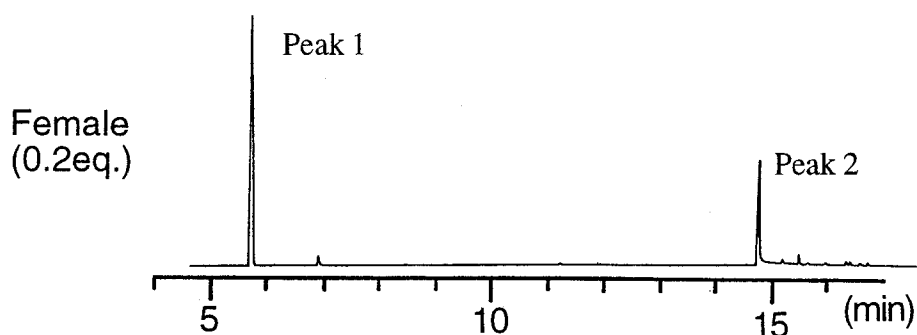


図 3-4-3 *Caloglyphus* sp. 2 雌へキサン抽出物のガスクロマトグラム

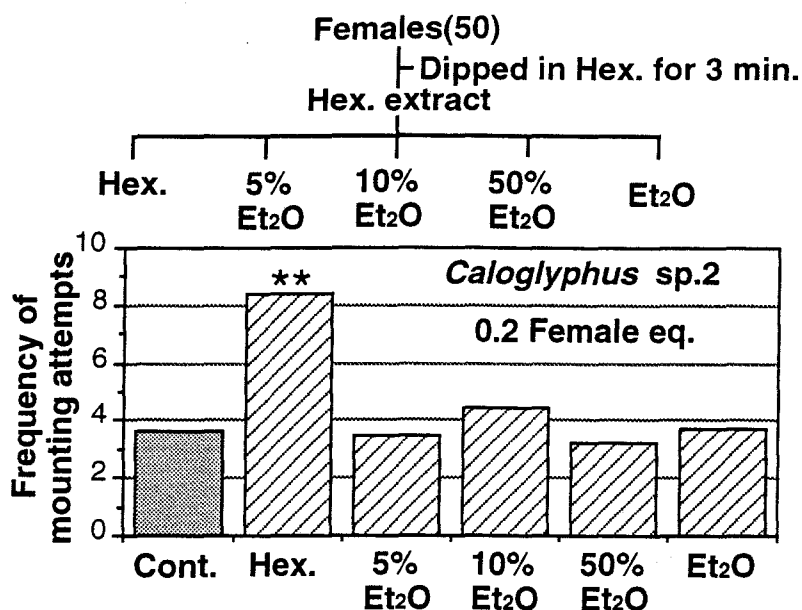


図3-4-4 雌ヘキササン抽出物のシリカゲルカラムによる分画と得られたフラクションの生物活性

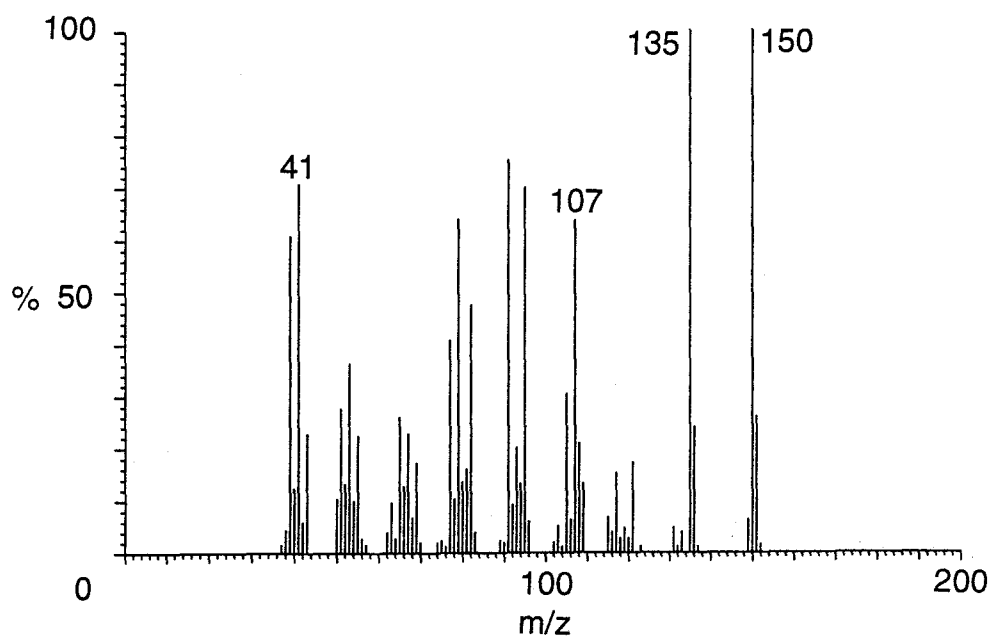


図3-4-5 雄のマウント行動を活性化する化合物の質量スペクトル

### 3-4-2 Rosefuran の合成と生物活性

Rosefuran の合成は 3-methylfuran と 3-methyl-2-butenylbromide を反応させる方法を用いた (Leal et al., 1989b) . 本方法では, 最終生成物として rosefuran と 4-methyl-2-(3-methyl-2-butenyl)-furan が約 1 : 1 の比率で生じ, 両者の分離には高速液体クロマトグラフィーが必要であった. しかしながら, 他の方法 (Buchi et al., 1968; Birchi and Slobbe, 1976; Takeda et al., 1977; Gedge and Pattenden, 1977; Tada et al., 1982; Takano et al., 1984) と比較すると, この方法では 1 段階の反応で rosefuran が得られることや試薬が入手し易いことから, 本方法を採用した. Rosefuran の合成過程の略図を図 3-4-6 に示した. また, 合成した rosefuran の<sup>1</sup>H-NMR スペクトルを図 3-4-7 に, 質量スペクトルを図 3-4-8 に示した.

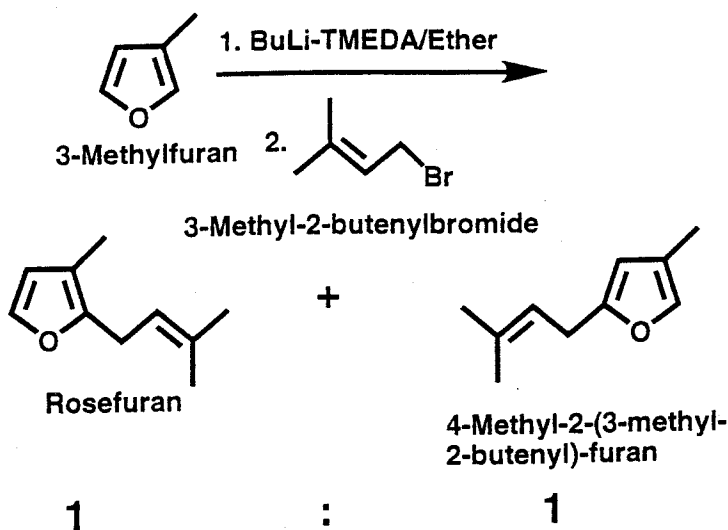


図 3-4-6 Rosefuran の合成過程

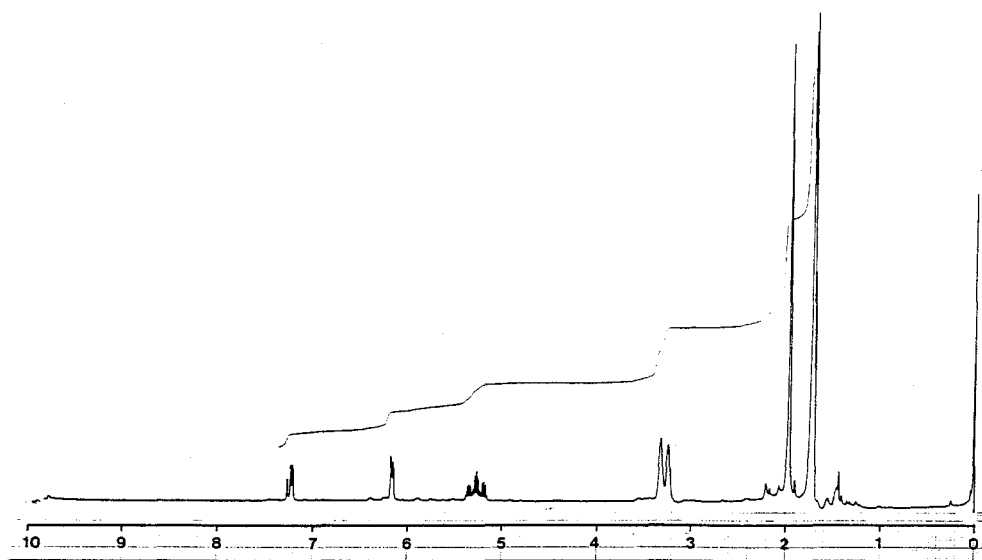


図3-4-7 合成 rosefuran の $^1\text{H}$ -NMRスペクトル

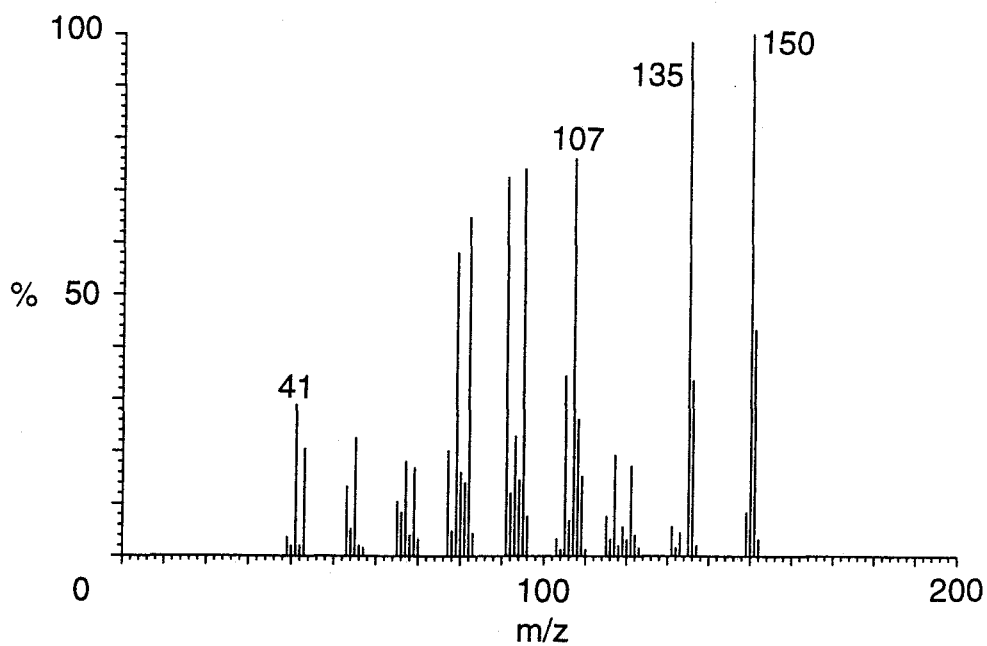


図3-4-8 合成 rosefuran の質量スペクトル

合成した rosefuran を用いて定量的に雄ダニのマウント活性を評価した図を図3-4-9に示す. 活性は2分間でミニシャーレ中に認められる雄ダニ同士のマウント回数で表した. ヘキサン処理したコントロールでは, 2分間で認められる雄ダニ同士のマウント回数は平均3.6回であった. Rosefuran を0.01 ng 及び0.1 ng 雄ダニに与えた場合, マウント回数はそれぞれ平均3.8回 ( $P > 0.05$ ) 及び3.6回 ( $P > 0.05$ ) となり, コントロールとの有意差は認められなかったが, 1 ng から1000 ng の rosefuran を与えた場合, マウント回数はそれぞれ平均7.4回 ( $P < 0.05$ ), 7.9回 ( $P < 0.01$ ) 及び6.8回 ( $P < 0.05$ ) となりコントロールと比較して有意にマウント回数の頻度が上がり, 活性であると判断した. しかし, 10  $\mu$ g ではマウント回数は平均4.7回 ( $P > 0.05$ ) に下がり, *Caloglyphus* sp. 2 でもフェロモンの投与量とマウントの回数との相関関係は極大値を持つ凸の曲線となった.

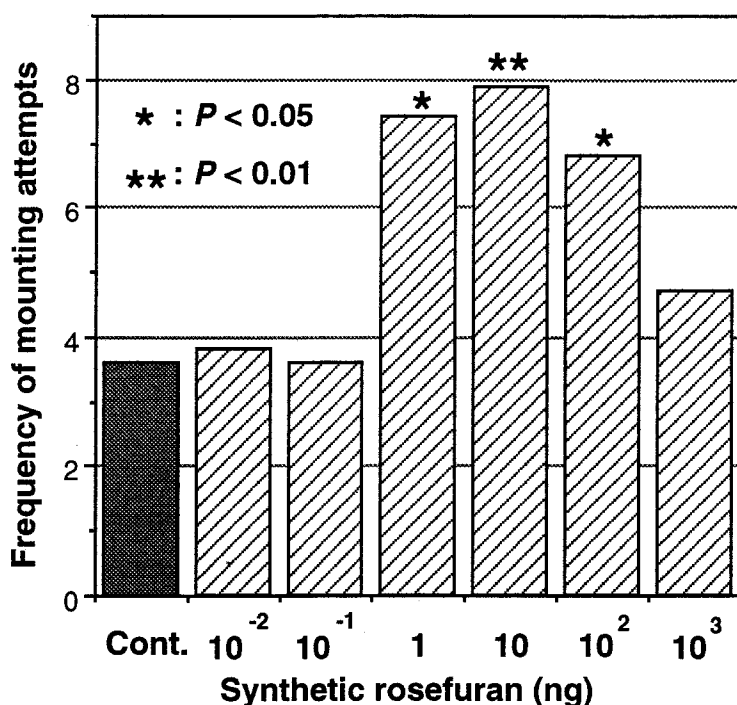


図3-4-9 合成 rosefuran が示す雄ダニマウント活性の定量的評価

### 3-4-3 雌の性フェロモンの分布様式

雄ダニのマウント行動を活発化する雌の性フェロモン rosefuran の存在を雌、雄及び第1若虫で調べた結果を図3-4-10に示す。3-2に示したコフキコガネ由来の *Caloglyphus* sp. 1 や3-3に示した *Caloglyphus rodriguezi* と同じように、本種のダニ *Caloglyphus* sp. 2 においても雌の性フェロモンは雌だけではなく雄にも体表の主要成分として検出された。しかしながら、第1若虫のヘキサン抽出物には rosefuran を検出できなかった。即ち、*Caloglyphus* sp. 2 では *C. rodriguezi* と同く雌性フェロモンは成虫特異的であると結論した。

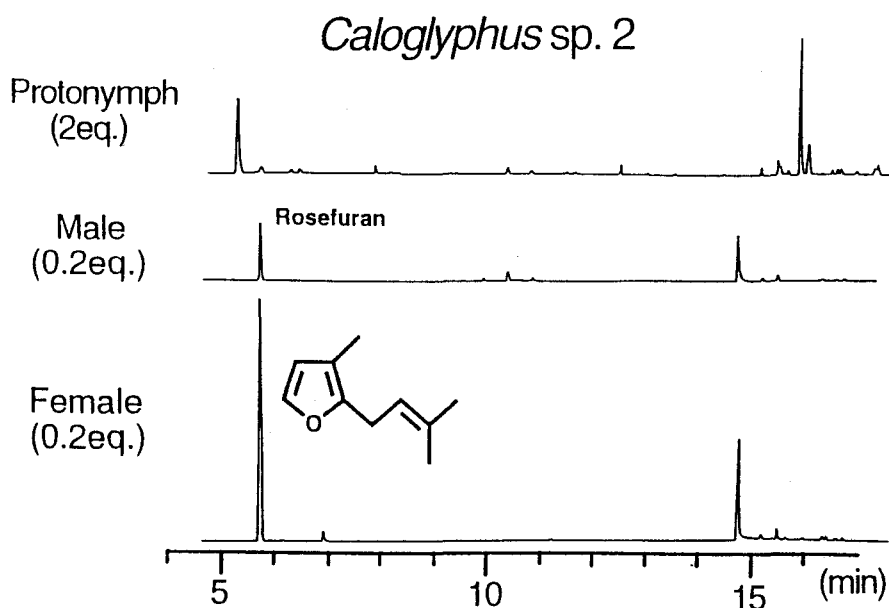


図3-4-10 雌、雄及び第1若虫ヘキサン抽出物のガスクロマトグラム

雄・雌の rosefuran の含量は、雌で  $87.6 \pm 14.2$  ng (平均値 $\pm$ SE,  $n = 20$ ) , 雄で  $10.4 \pm 2.5$  ng (平均値 $\pm$ SE,  $n = 20$ ) であった。また、雌性フェロモンの含有量は雌雄間で有意差が認められた (Mann-Whitney  $U$  test,  $P < 0.001$ ,  $n = 40$ ) 。また、雌雄間の雌性フェロモン含有量の比率は 8.4/1 (雌/雄) となり、今回用いたゴミコナダニ属4種の中では雌性フェロモンの雌雄間における比率が最も大きな数値となる例となった。雌雄間の雌性フェロモ

ン含量を調べた結果を図3-4-11に示す。

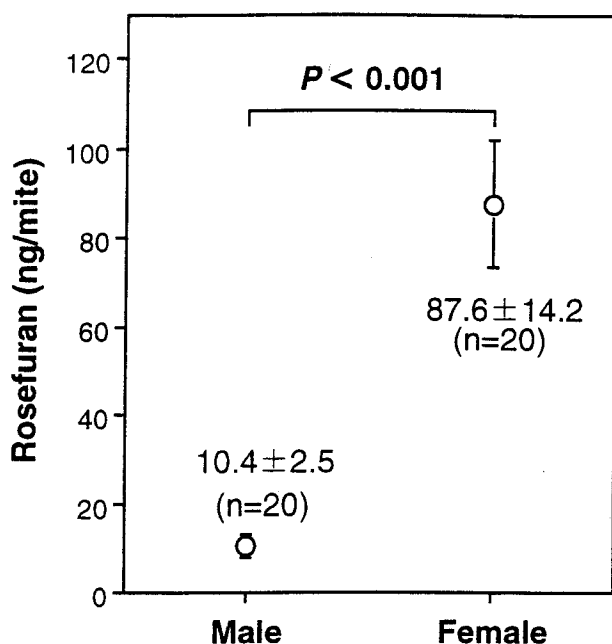


図3-4-11 雌雄間における雌性フェロモン含有量の比較

*Caloglyphus* sp. 2

#### 3-4-4 考察

ナガチャコガネよりヒポプスとして得られた未同定種のゴミコナダニ属ダニ *Caloglyphus* sp. 2 の雌の性フェロモンとして rosefuran を同定した。ミニシャーレを用いた生物試験では rosefuran を塗布した濾紙に雄ダニが誘引され濾紙に執着する行動が認められ、濾紙に対して盛んにタッピング行動を示す雄ダニも観察された。*Caloglyphus* sp. 1 や *C. rodriguezi* の場合と同様に本種のダニ *Caloglyphus* sp. 2 でもその誘引活性を定量的に評価する事はできなかったが、誘引活性の定性的な評価を得ることはできた。誘引活性の定量的な評価が困難な原因としては、雄ダニの条件付けの仕方やサンプルの与え方等が考えられる。しかしながら、本種ダニの雌雄間における交尾行動を観察していると、雄ダニが雌ダニのすぐ横にいるにも関わらずマウント行動に至らない場合もあり、そもそもゴミコナダニ属ダニの雌性フェロモンの誘引力



は昆虫に一般に認められるほど強力でない可能性もあると考えられた。これに対して、*rosefuran* が雄ダニのマウント行動を活発化することは図 3-4-10 に示すように定量的に評価できた。以上の結果から、*Caloglyphus* sp. 2 でも雌性フェロモンは雄にマウント行動を解発すると共に雄誘引活性をも示すと結論した。これは本研究で用いたゴミコナダニ属 3 種で共通に認められた。

この性フェロモンの雌、雄及び第 1 若虫での分布を調べた結果、性フェロモンは成虫特異的であると結論した。この性フェロモンが雌雄両方に主要成分として認められることは、この雌の性フェロモンが既知のコナダニ科の *Caloglyphus polyphyllae* (Leal et al., 1989a)、ムギコナダニ *Aleuroglyphus ovatus* (Kuwahara et al., 1992) 及びオソアシブトコナダニ *Acarus immobilis* (Sato et al., 1993) で共通であった。また、雌の性フェロモンが成虫特異的である例はムギコナダニ *A. ovtus* でも報告されているが (Kuwahara et al., 1992)、この場合は若虫を第 1 若虫と限定していない。

### 3-4-5 実験の部

#### ダニ

本研究で用いた *Caloglyphus* sp. 2 の由来と飼育方法は 2-4 に示した。本種のダニは現在同定の為の研究が進行中である。

#### 生物試験方法

本実験ではミニシャーレを用いて生物試験をおこなった。ミニシャーレ（内径：10 mm，高さ：5 mm）に濾紙を 2 枚敷き、ピペットで水道水を 1 滴濾紙に落とし適度に湿らせた後、水で粘土状とした乾燥酵母を少量濾紙上に飼料として置いた。飼育母集団からミニシャーレ内に枝付バリエで 10 頭の雄ダニを導入した後、ダニが逃げないようにカバーグラスで蓋をした。雄ダニを移植する際には、雄ダニの以前の交尾経験は一切考慮しなかった。雄ダニを条件付けする際にミニシャーレ内の湿度低下を防ぐため、カバーグラスで

蓋をした。これらのミニシャーレは5個毎を水で十分湿らせた綿の入ったガラス容器とともにプラスチックシャーレ（内径：85 mm，高さ：20 mm）に入れた。生物試験は全て室温で行い，濾紙にヘキサンを塗布したものをコントロールとして用いた。

数時間条件付けした後，一定量のサンプルを塗布した濾紙（3 mm×3 mm）を雄ダニに影響を与えないようにほぼ中央に置いて，雄ダニの行動を2分間ハロゲンランプの照射下（6V-10W）実体顕微鏡で観察し，雄同士のマウント回数で評価した。この生物試験法は各処理区それぞれ10回繰り返して行った。

得られた結果は，Kruskal-Wallis 法で評価した後 Dann の方法に従って多重比較した（高木正見，1985）。

#### フェロモンの抽出，精製及びサンプル調整

フェロモンの抽出，精製及びサンプル調整は3-2-5で示す方法に従った。

交尾の経験を問わない条件で，雌ダニ50頭をヘキサン100  $\mu$ Lに浸漬し，雌ダニ抽出液とした。抽出時間は，50頭目のダニをヘキサンに浸漬して3分後までとした。得られた抽出液をシリカゲル（500 mg, Wako-gel C-200，和光純薬工業）に吸着させ，3 mLの溶出溶媒で段階的に溶出した。溶出溶媒にはヘキサン／エーテル系で行い，ヘキサン，5%，20%，50%エーテル含有ヘキサン及びエーテルを用いた。

雌のヘキサン抽出物に対する雄の反応をガラス棒法で評価する際，各サンプルは以下のように調整した。3頭の雌ダニを300  $\mu$ Lのヘキサンに3分間浸漬し1  $\mu$ Lをガラス棒の先端に塗布した場合，これを0.01雌ダニ当量とした。ダニ当量の基準を要するサンプルは全て同じ方法で調整した。

フェロモンの定量は以下のように行った。底を紡錘形にしたガラス製チューブ（外径：8 mm，高さ：30 mm，手製）に内部標準として tetradecane（10 ng/ $\mu$ L）を含むヘキサン（5  $\mu$ L）を入れ，交尾の経験を問わない1頭の雌ダニ

を枝付バリで入れた。ダニをヘキサンに入れてから3分後、ヘキサン抽出物の1 $\mu$ L (0.2当量) をガスクロマトグラフ法で分析した。雄ダニも雌と同じように処理した。一方、第1若虫は10頭を5 $\mu$ Lのヘキサンで抽出し、1 $\mu$ L (2当量) をガスクロマトグラフ法で分析した。実験より得られた rosefuran / tetradecane のピーク比を予め作製した合成した rosefuran と tetradecane の検量線 ( $r^2 = 0.999$ ) に代入して、ダニ虫体から抽出された rosefuran 量を算出した。このフェロモン定量のために、サンプル数は雄・雌共に20頭ずつ計40頭とした。雌雄間のフェロモン含量の統計的な有意差の検定は、ノンパラメトリックな独立2群間の検定に用いられる Mann-Whitney U test (Stat View II) により行った。

## 化学分析

3-2-5, 3-3-5 実験の部・化学分析を参照。

## Rosefuran の合成

3-Methylfuran (1 g, 12.2 mmol) を無水エーテル (10 mL) に溶解し、窒素気流下 $-78^{\circ}\text{C}$  (ドライアイス/アセトン) で無水 tetramethylethylenediamine (1.4 g, 12 mmol) を加え5分間攪拌した。その後、*n*-butyllithium のヘキサン溶液 (1.6 M, 7.7 mL) をシリンジで滴下した後、室温に戻し15分間攪拌した。再度、 $-78^{\circ}\text{C}$  に戻し 4-bromo-2-methyl-2-butene (1.8 g, 12.2 mmol) の無水エーテル溶液 (10 mL) を加え、20分間反応させた。反応終了後更にエーテル (10 mL) を入れ、15分間環流煮沸した。十分に冷やした後、水 (30 mL) を加えて、有機層と水層に分けた。水層は等量のエーテルで3回抽出して、これを有機層に加えた。得られた有機層は2N-HCl 溶液、5% 炭酸水素ナトリウム溶液 (2回) 及び飽和食塩水で分液し、 $\text{Na}_2\text{SO}_4$  で乾燥した。この有機層をガスクロマトグラフィーで分析したところ、rosefuran と 4-methyl-2-(3-methyl-2-butenyl)-furan がほぼ1:1の混合物であった。

この有機層の粗抽出物 (2g) をシリカゲルカラム (50 g, Wako-gel C-

200, 和光純薬工業) に吸着させヘキサンで溶出した。得られたフラクションをガスクロマトグラフ法で分析したところ, rosefuran と 4-methyl-2-(3-methyl-2-butenyl)-furan を完全に分離できなかった。そこで, rosefuran が主要成分であるフラクションの一部を高速液体クロマトグラフィーで分離し, rosefuran を精製した。順層のカラムには YMC-Pack A-024 S-5 60A Sil (Yamamura Chemical Laboratories Co., LTD.) を用い, ヘキサン 4 mL/min で溶出し, 254 nm で検出した。一方, 同じように 4-methyl-2-(3-methyl-2-butenyl)-furan も精製した。

Rosefuran の物理化学的データを以下に示す。 $^1\text{H-NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ ) :  $\delta$  = 1.70 (d, 3H,  $J$  = 1.31 Hz), 1.72 (d, 3H,  $J$  = 1.31 Hz), 1.96 (s, 3H), 3.26 (d, 2H,  $J$  = 7.11 Hz), 5.26 (triple heptet, 1H,  $J$  = 7.11 Hz and 1.31 Hz), 6.15 (d, 1H,  $J$  = 1.86 Hz), 7.20 (d, 1H,  $J$  = 1.86 Hz);  $^{13}\text{C-NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ ) :  $\delta$  = 9.7, 17.7, 25.3, 25.6, 112.9, 113.4, 120.2, 132.9, 139.8, 150.2; MS  $m/z$  150 ( $\text{M}^+$ , 100%), 135 ( $\text{M}^+ - \text{CH}_3$ , 99.9%), 107 (63.7%), 95 (70.2%), 91 (75.4%), 82 (47.8%), 79 (63.9%), 65 (26.0%), 41 (70.7%), 39 (60.7%)。また, HP-5 を用いた上述した条件でのキャピラリーガスクロマトグラフィーの分析では, rosefuran の保持時間は 5.8 分であった。

4-Methyl-2-(3-methyl-2-butenyl)-furan の物理化学的データを以下に示す。 $^1\text{H-NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ ) :  $\delta$  = 1.68 (d, 3H,  $J$  = 1.5 Hz), 1.73 (d, 3H,  $J$  = 1.5 Hz), 1.97 (d, 3H,  $J$  = 1.09 Hz), 3.30 (d, 2H,  $J$  = 7.23 Hz), 5.30 (triple heptet, 1H,  $J$  = 7.23 Hz and 1.5 Hz), 5.83 (s-like, 1H), 7.04 (s-like, 1H);  $^{13}\text{C-NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ ) :  $\delta$  = 9.97, 17.9, 25.8, 27.4, 107.8, 119.8, 120.7, 133.9, 137.7, 155.3; MS  $m/z$  150 ( $\text{M}^+$ , 100%), 135 ( $\text{M}^+ - \text{CH}_3$ , 97.3%), 107 (89.9%), 95 (60.8%), 91 (83.5%), 82 (54.7%), 79 (73.4%), 67 (38.7%), 41 (37.6%)。また, HP-5 を用いた上述した条件でのキャピラリーガスクロマトグラフィーの分析では, 4-methyl-2-(3-methyl-2-butenyl)-furan の保持時間は 6.1 分であった。

### 3-5 *Caloglyphus polyphyllae* の雌の性フェロモン

#### 3-5-1 緒言

コナダニ科の雌の性フェロモンはゴミコナダニ属の *Caloglyphus polyphyllae* で初めて同定された (Leal et al., 1989a) . この性フェロモン  $\beta$ -acaridial は *C. polyphyllae* の雄の誘引活性と雄にマウント行動を解発する. この時には雌の性フェロモンの分布は十分に検討されておらず, 雄の抽出物は雄ダニに対して何の反応も引き起こさなかった事実だけが報告されている. 続いてコナダニ科のムギコナダニ *Aleuroglyphus ovatus* で雌の性フェロモンが同定された際には, 雌の性フェロモンは雌だけではなく雄にも主要成分として検出されたが若虫には検出できなかった (Kuwahara et al., 1992) . 更に, コナダニ科のオソアシブトコナダニ *Acarus immobilis* では雌の性フェロモンは雌や雄だけではなく若虫にも主要成分として検出された (Sato et al., 1993) .

そして, 今回新たにゴミコナダニ属ダニ3種で雌の性フェロモンを同定し, その分布について雌, 雄及び第1若虫で調べた. その結果, *Caloglyphus* sp. 1 では雌の性フェロモンは雌, 雄及び第1若虫に主要成分として認められた. これに対し, *Caloglyphus rodriguezi* や *Caloglyphus* sp. 2 では雌の性フェロモンは雌雄共に認められたものの第1若虫には殆ど存在せず, 雌の性フェロモンの分布は成虫特異的と考えられた.

そこで, *C. polyphyllae* についても雌の性フェロモンの分布を今回の一連の研究と同じように検討を試みた.

#### 3-5-2 雌の性フェロモンの分布様式

*C. polyphyllae* において雄ダニの誘引活性とマウント行動を解発する雌の性フェロモン  $\beta$ -acaridial の分布を雌, 雄及び若虫で調べた. 結果を図3-5-1に示す.  $\beta$ -Acaridial は雌・雄共に主要成分として検出され, 更に若虫にも主要成分として認められた. 従って, *C. polyphyllae* 雌の性フェロモン分布様式はコフキコガネ由来の *Caloglyphus* sp. 1 と同様であった.

$\beta$ -Acaridial の雄・雌の含量を内部標準との比率で比較すると、雌では  $0.23 \pm 0.044$  (平均値  $\pm$  SE,  $n = 20$ ) であるのに対して雄では  $0.068 \pm 0.015$  (平均値  $\pm$  SE,  $n = 20$ ) であった。この値から雌雄間の雌の性フェロモンの含有量の比率を求めると 3.4/1 (雌/雄) となった。また、雌の性フェロモンの含有量は雌雄間で有意差が認められた (Mann-Whitney  $U$  test,  $P < 0.01$ ,  $n = 40$ )。得られた結果を図 3-5-2 に示す。

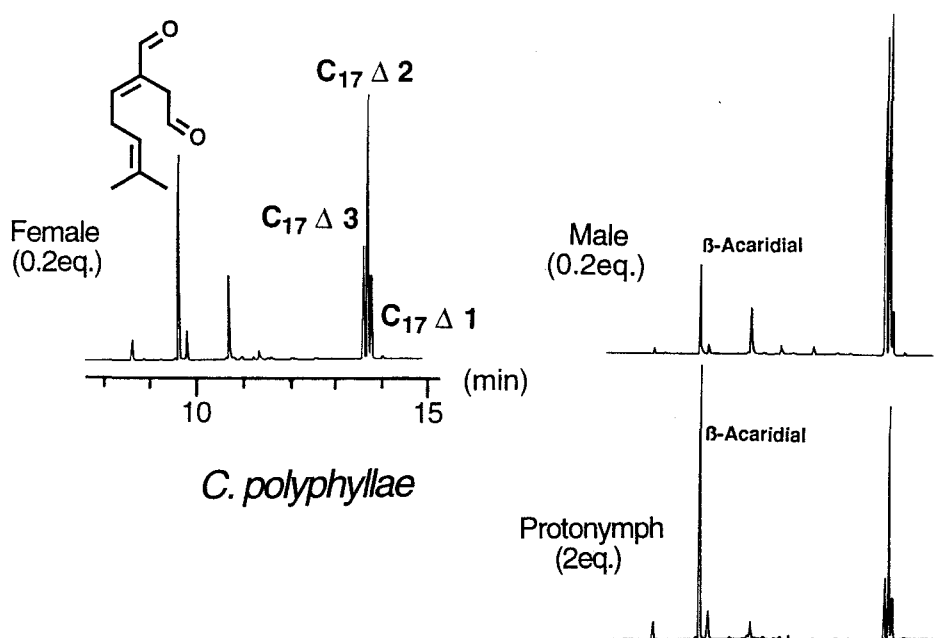


図 3-5-1 雌，雄及び第 1 若虫ヘキサン抽出物のガスクロマトグラム

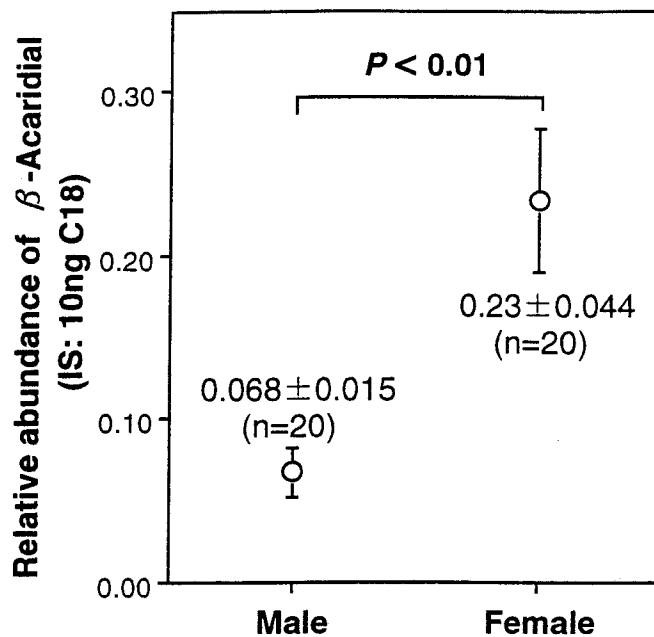


図 3-5-2 雌雄間における雌の性フェロモン含有量の比較  
*Caloglyphus polyphyllae*

### 3-5-3 実験の部

#### ダニ

本実験で用いた *Caloglyphus polyphyllae* の由来と飼育方法は 2-4 に示す。

#### フェロモンの抽出と定量

底を紡錘形にしたガラス製チューブ（外径：8mm，高さ：30 mm，手製）に内部標準として octadecane (10 ng / $\mu$ L) を含むヘキサン (5  $\mu$ L) を入れ，交尾の経験を問わない条件で，1頭の雌ダニを枝付バリで入れた。ダニをヘキサンに入れてから3分後，ヘキサン抽出物の1 $\mu$ L（0.2当量）をガスクロマトグラフ法で分析した。雄ダニも雌と同じように処理した。一方，第1若虫は10頭を5 $\mu$ Lのヘキサンで抽出し，1 $\mu$ L（2当量）をガスクロマトグラフ法で分析した。 $\beta$ -Acaridialの雄・雌の含量は $\beta$ -acaridial / octadecaneにピーク比で示した。このフェロモン定量のためのサンプル数は雄・雌共に

20 頭ずつ計 40 頭である．雌雄間のフェロモン含量の統計的な有意差の検定は，ノンパラメトリックな独立 2 群間の検定に用いられる Mann-Whitney  $U$  test (Stat View II) により行った．



### 3-6 3章のまとめ

本研究で新たにゴミコナダニ属ダニ3種から雌の性フェロモンを同定した。即ち、コフキコガネからヒポプスとして得たゴミコナダニ属の未同定種 *Caloglyphus* sp. 1 から (2R, 3R)-epoxyneral を、つくば市の畑土から得た *Caloglyphus rodrigezi* から undecane を、及びナガチャコガネよりヒポプスとして得たゴミコナダニ属の未同定種 *Caloglyphus* sp. 2 から rosefuran を、雌の性フェロモンとして同定した。また、雌の性フェロモンが既知である *Caloglyphus polyphyllae* も含めたゴミコナダニ属ダニ合計4種で雌の性フェロモンの分布を比較検討した。結果を表3-6-1に示す。

表3-6-1 雌の性フェロモンの分布と雌雄間の含有量比

Distribution	Species	Female/Male
Female, Male and protonymph	<i>Caloglyphus</i> sp. 1	1.4/1
	<i>C. polyphyllae</i>	3.4/1
Female and Male	<i>C. rodrigezi</i>	6.3/1
	<i>Caloglyphus</i> sp. 2	8.4/1

今回用いたゴミコナダニ属ダニ4種ではいずれも雌の性フェロモンは雌雄共に主要成分として検出されたが、成虫と同様に第1若虫にも雌の性フェロモンが主要成分として存在するか否かで2群に分けることができた。また、雌の性フェロモンの含有量比を雌雄間（雌/雄）で調べたところ、その比は *Caloglyphus* sp. 1 では 1.4/1 に、*C. polyphyllae* では 3.4/1 に、*C. rodrigezi* では 6.3/1 に、そして *Caloglyphus* sp. 2 では 8.4/1 になった。このフェロモン含有量の比とフェロモンの分布様式を併せて見ると、雌の性フェロモンが成虫に特異的になっている *C. rodrigezi* と *Caloglyphus* sp. 2 の2種でフェロモンの比は大きく、フェロモンは雌に偏って存在する一方、雌の性フェロモンが第1若虫にも成虫と同様に主要成分として検出できた *Caloglyphus* sp. 1 と

*C. polyphyllae* ではフェロモンの比は小さかった。すなわち、雌の性フェロモンの成虫特異性と雌雄間での量比に連続性が認められた。

本研究で雌の性フェロモンの機能を検討した結果、ゴミコナダニ属ダニの雌の性フェロモンには、弱い雄ダニ誘引活性と雄ダニにマウント行動を解発する、2つの機能があると結論した。これは雄ダニ誘引フェロモンとマウント性フェロモンがそれぞれ2,6-dichlorophenol と choresteryl oleate という別の化合物で制御されているマダニ科のダニとは大きく異なる点である (Sonenshine et al., 1991)。また、今回雌の性フェロモンが同定されたゴミコナダニ属3種を含めて、雌の性フェロモンが既知のコナダニ科ダニ6種では、いずれもその性フェロモンが雌ダニだけではなく雄ダニにも認められた。このような場合に、雄ダニがマウントする対象として雌雄の識別ができるか否か、は大変重要な問題となる。本研究ではゴミコナダニ属ダニ4種において雌雄間の雌の性フェロモン含有量を検討した結果、いずれのダニでも雌の性フェロモンの含有量は有意に雌の方が多かった。しかしながら、そのフェロモン量の差が雄ダニの雌雄識別に寄与しているか否かは、現在まで検討されていない。仮に、雌の性フェロモン含有量の差が雄ダニに雌雄の識別を可能にしているならば、本研究で用いた4種のゴミコナダニ属ダニで、雌雄間における雌の性フェロモンの含有量比が、小さな *Caloglyphus* sp. 1 (1.4/1) とその比が大きな *Caloglyphus* sp. 2 (8.4/1) では、雄ダニによる雌雄の識別に何らかの差異が認められるのではないかと考えられた。そこでゴミコナダニ属ダニ4種における雄ダニによる雌雄の識別について検討した結果を第4章で述べる。

### 4-1 緒言

昆虫の性行動において、一般に性フェロモンは異性認識を制御する情報伝達物質として機能すると考えられている。多くの場合、性フェロモンを放出するのは雌であるが、雄が雌を誘引する性フェロモンを放出する例も明らかになっている（西田律夫，1985）。その殆どの例で、性フェロモンは一方の性から放出され異性を誘引したり、性的な興奮状態を引き出すなど、異性認識の化学信号として機能している。ところが、本実験で用いたゴミコナダニ属ダニ4種を含めたコナダニ科6種で認められたように、性行動のあるステップを制御する性フェロモンが雌雄ともに検出される場合では、性フェロモンが雌雄の認識に役立っているのか否かという興味深い問題が生じる。そこで本章では、雄ダニによる雌雄の識別の有無を検討した。

### 4-2 ゴミコナダニ属ダニ4種の雄による雌雄の識別

第2章で述べたように、ゴミコナダニ属ダニの配偶行動の初期段階では、雄がより積極的に雌に働きかける。また、雄1頭のシャーレに雌を1頭入れて観察する実験（雄条件付け雌導入試験）と、雌1頭のシャーレに雄を1頭入れて観察する実験（雌条件付け雄導入試験）の間で、導入後タッピング行動が雄ダニに観察される時間の分布に、有意差は認められなかった。しかしながら、本研究では、雄による雌雄の識別を調べる生物試験として、交尾行動の初期段階で積極的な役割を果たす雄に影響がより少ないと思われる方法を選んだ。すなわち雄1頭を条件付けした後、雌または雄を導入し雄・雌間および雄・雄間の相互作用について観察した（図4-2-1）。

雄ダニによる雌雄の識別の評価は2通りの方法で実施した。1つはダニ導入から14分間の行動を観察し、雄ダニが両方の第一脚で導入ダニの虫体を交互にトントンと叩く行動（タッピング行動）を示すか否かを調べるものである。雄ダニを導入した場合と雌ダニを導入した場合とで、タッピング行動

の観察できた例数と観察されなかった例数を計測し比較した（反応/非反応試験）。なお、14分という時間は、本実験で用いたゴミコナダニ属ダニ4種において、雄ダニに雌ダニを導入した場合にその85%以上にタッピング行動が認められる時間である。

もう1つは2章で用いた方法である。すなわち、タッピング行動が観察されるまでに要した時間の分布に、統計的な有意差があるかないかを、評価するものである（時間分布試験）。

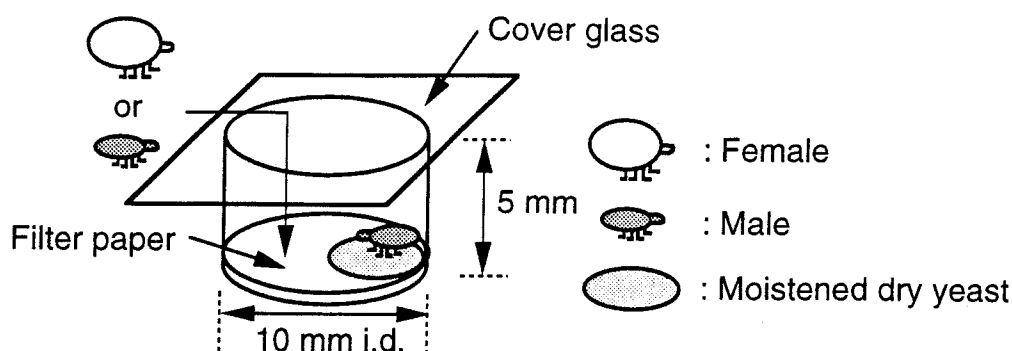


図4-2-1 雄による雌雄識別の有無を調べる生物試験法

実験に用いたゴミコナダニ属ダニ4種で、タッピング行動が観察された例数と観察されなかった例数を、条件付け雄ダニに雄ダニを導入した場合と雌ダニを導入した場合とで比較した。結果を表4-2-1に示す。表4-2-1に示すように、*Caloglyphus* sp. 1では雄ダニを条件付けした後、雄ダニを導入しても雌ダニを導入しても、14分間で反応した例数と反応しなかった例数に有意差は認められなかった ( $P > 0.05$ ,  $n = 60$ )。これに対して、他の3種 *C. polyphyllae*, *C. rodriguez* 及び *Caloglyphus* sp. 2では、いずれも雌を導入した場合に、タッピング行動の認められた例数が有意に多くなった（それぞれ、 $P < 0.05$ ,  $n = 60$ ;  $P < 0.01$ ,  $n = 120$ ;  $P < 0.05$ ,  $n = 80$ ）。

表4-2-1 ゴミコナダニ属ダニ4種において雌または雄を導入した場合のタッピング行動を示した雄の数

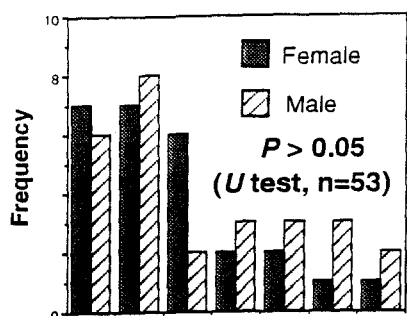
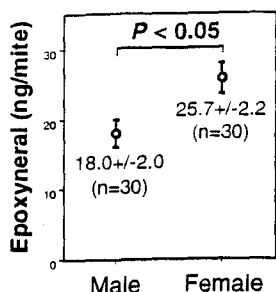
	Female		Male		Probability
	+	-	+	-	
<i>Caloglyphus</i> sp. 1	26	4	28	2	N. S.
<i>C. polyphyllae</i>	28	2	22	8	< 5%
<i>C. rodriguezi</i>	59	1	39	21	< 1%
<i>Caloglyphus</i> sp. 2	34	6	26	14	< 5%

+: Responded mite(s)

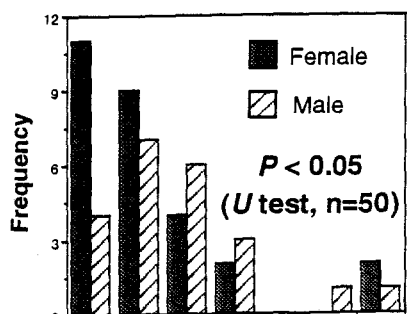
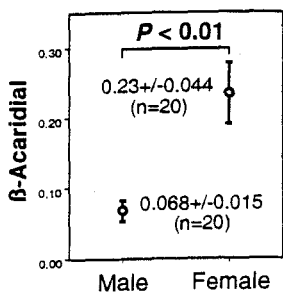
-: Not-responded mite(s)

次に、タッピング行動が観察されるまでに要した時間の分布を、雌ダニを導入した場合と雄ダニを導入した場合とで比較した。得られた結果を、3章で示した各ゴミコナダニ属4種の雌雄間のフェロモン含量と併せて図4-2-2に示す。*Caloglyphus* sp. 1では雌ダニを導入した場合に、最初の4分で全28例中の20例(53%)にタッピング行動が観察された。同種のダニで雄ダニを導入した場合、最初の4分でタッピング行動が観察されたのは全22例中の11例(52%)であり、雌ダニを導入した場合と雄ダニを導入した場合とで、タッピング行動の開始時間に統計的な有意差は検出されなかった( $P > 0.05$ ,  $n=53$ )。これに対して、他の3種 *C. polyphyllae*, *C. rodriguezi* 及び *Caloglyphus* sp. 2では雌を導入した場合の方が、有意に早くタッピング行動を観察でき(それぞれ,  $P < 0.05$ ,  $n = 50$ ;  $P < 0.01$ ,  $n = 98$ ;  $P < 0.05$ ,  $n = 60$ )。特に *C. rodriguezi* や *Caloglyphus* sp. 2では、雌ダニを導入した場合、最初の4分間で全体の60%以上にタッピング行動が観察できたが、一方、雄ダニを導入した場合ではその割合は30%程度となり、明らかに雌ダニを導入した場合と雄ダニを導入した場合とで、タッピング行動の観察されるまでに要する時間分布の形が異なると思われた。

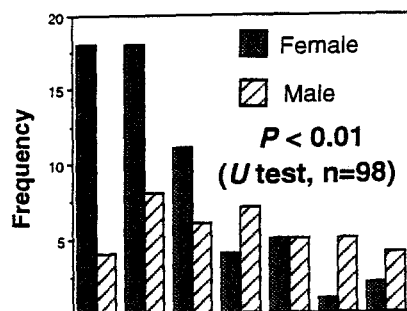
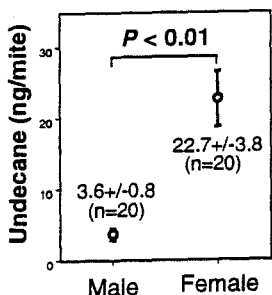
*Caloglyphus* sp. 1



*C. polyphyllae*



*C. rodriguezi*



*Caloglyphus* sp. 2

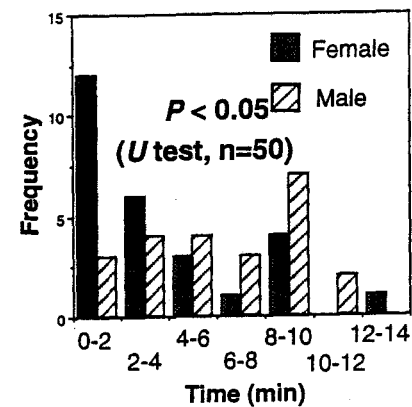
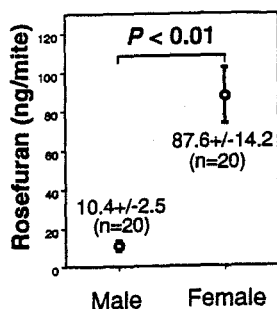


図4-2-2 ゴミコナダニ属4種において雄のタッピング行動が観察された時間の分布と性フェロモンの含有量

以上、条件付け雄ダニに雄ダニを導入した場合と雌ダニを導入した場合で、一定時間内にマウント行動の第一段階であるタッピング行動が観察された例数やタッピング行動が観察されるまでに要した時間の分布を比較し、これにより雄ダニがマウントする対象として雌ダニと雄ダニを識別しうるのか否かを検討した。この結果、*Caloglyphus* sp. 1 ではいずれの実験系でも雄ダニはマウントする対象として雌雄を識別していないと結論した。一方、*C. polyphyllae*, *C. rodriguzi* 及び *Caloglyphus* sp. 2 の3種では、完全に雌雄を識別し雄同士のマウントが一切認められないわけではないが、いずれの実験系でも有意差が認められた。従って、雄と雌が混在している場合では上記3種の雄ダニはマウントの対象として雌を有意に選択し得るが、*Caloglyphus* sp. 1 の雄ダニはマウントの対象として雌雄を識別できないと考えられた。

#### 4-3 考察

3-6 で述べたように、本研究で用いたゴミコナダニ属ダニ4種ではいずれもその雌の性フェロモンは雌ばかりではなく雄にも認められた。雌の性フェロモンの含有量はいずれの種でも雌の方が雄よりも有意に多いものの、その比率（雌/雄）は種によって様々であった。3-6 では更にこの雌性フェロモンの含有量の雌雄間における差異が、雄ダニによる雌雄識別に寄与していると仮定し、この検証のために本章で述べた実験を行った。得られた結果と3章で述べた雌雄間における雌性フェロモンの平均含有量比（雌/雄）を考え併せて以下の結果を得た。すなわち、4種の中で最も比率の小さな *Caloglyphus* sp. 1 (1.4/1) の雄ダニでは雌雄の識別が成されていないのに対し、比率のより大きい他の3種、*C. polyphyllae* (3.4/1), *C. rodriguzi* (6.3/1) 及び *Caloglyphus* sp. 2 (8.4/1) の雄ダニでは、完全とは言えないまでも、雌雄の識別は成されていると考えられた。従って、雌の性フェロモンの雌雄間における量的な差異が雄ダニの雌雄の識別に寄与していると結論した。

3章の各節で本実験に用いたゴミコナダニ属ダニ4種の雌雄におけるフェロモン含量を平均値±SEMで示した。しかし、それらのデーターから個体

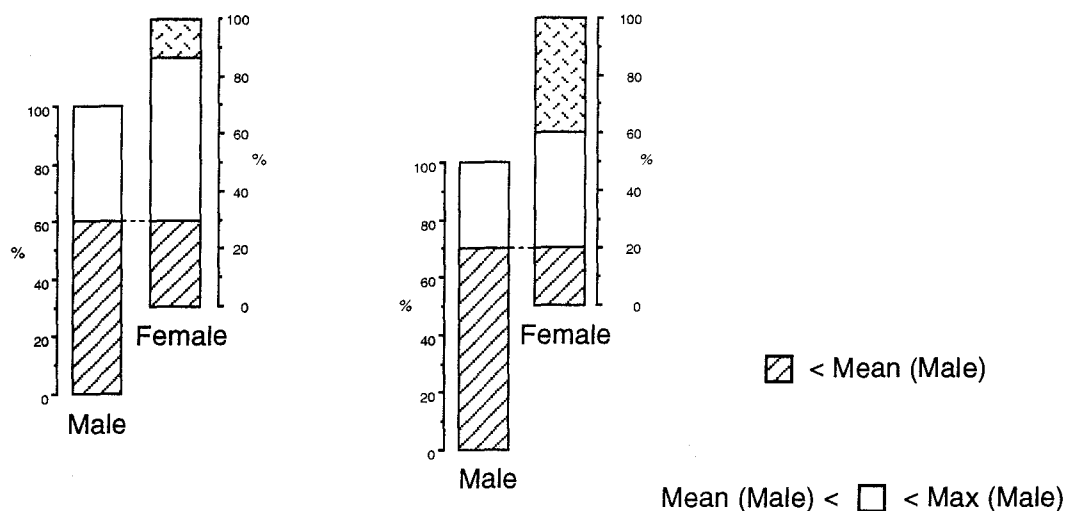
相互間で雌の性フェロモン含量にどの程度のバラツキがあるのか、直接想像することは難しい。本章でフェロモンの含有量が雄ダニによる雌雄の識別に重要な役割を果たしているとは結論した以上、フェロモン含有量の個体間のバラツキをもう一度詳細に検討したい。そこで、雄の平均フェロモン含有量と雄の最大フェロモン含有量を基準として、3章で得たデーターを整理し直した。結果を図4-3-1に示す。着目した点は雄の平均含有量を下回るフェロモン量の雌及び雄の最大含有量を上回るフェロモン量の雌がどのくらい存在するかという2点である。

雄の平均含有量を下回るフェロモン量しか持たない雌の存在率は *Caloglyphus* sp. 1 で 30%, *C. polyphyllae* で 20%, *C. rodriguzi* で 20% 及び *Caloglyphus* sp. 2 で 5% であった。雌雄間の平均フェロモン量比の値（雌/雄）が小さくなるにつれてその存在率も小さくなるものの、いずれのゴミコナダニ属ダニにおいても、雄の平均含有量を下回るフェロモン量しか持たない雌は存在した。従って、雌の性フェロモンの含有量の差異で雄ダニは雌雄を識別しているならば、これら4種では飼育容器内でも雄ダニ同士のマウント行動はある頻度で認められることになるかと予想され、実際その通りであった。しかし、雄ダニは他の雄ダニにマウントされることを嫌うように見受けられ、マウントされそうになると逃げる傾向がある。それ故、*Caloglyphus* sp. 1 でも実際の飼育容器内で雄ダニ同士がマウント行動をしている場面が、雌雄間のマウント行動とほぼ同程度に認められるという訳ではない。

一方、雄の最大含有量を上回るフェロモン量を持つ雌の存在率は *Caloglyphus* sp. 1 で 13%, *C. polyphyllae* で 40%, *C. rodriguzi* 及び *Caloglyphus* sp. 2 で 70% と雌雄間の平均フェロモン量比の値（雌/雄）が大きくなるにつれてその存在率は増えていった。雄の最大含有量を上回るフェロモン量を持つ雌の存在率が高くなるほど、雄ダニにとって雌雄の識別が容易になるのは当然の帰結であろう。



## *Caloglyphus* sp. 1      *C. polyphyllae*



## *C. rodriguezi*

## *Caloglyphus* sp. 2

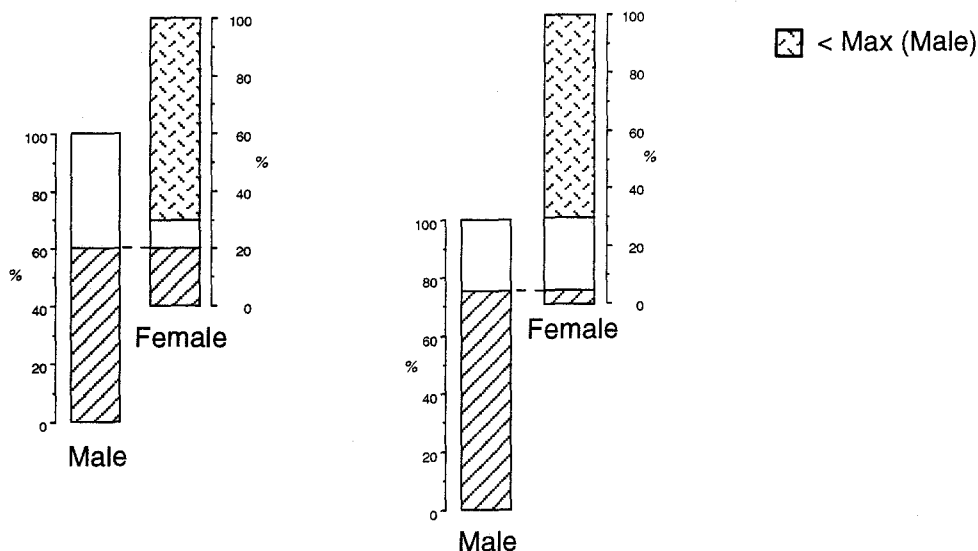


図4-3-1 ゴミコナダニ属ダニ4種における雌の性フェロモンの分布様式

### 4-4 実験の部

#### 生物試験方法

ミニシャーレ（内径：10 mm，高さ：5 mm）に濾紙を2枚敷き，水を一滴落として湿らせた．飼料を少量枝付バリで濾紙上に置き，更に十分に成熟

した雄1頭を導入した。導入後、ダニが逃げないようにカバーガラスで蓋をした。乾燥を防ぐため、水で十分湿らせた綿の入ったガラス容器と、ミニシャーレ5個をプラスチックシャーレ（内径：85 mm，高さ：20 mm）に移し入れた後、これを数時間放置して条件付けした。その後、ストックカルチャーから十分に成熟した雄（または雌）1頭を出来る限り刺激しないように枝付バリでそれぞれのミニシャーレに入れた。ミニシャーレ内の行動観察は室温下ハロゲンランプ（6V-10W）で照明しながら、実体顕微鏡下に行った。ゴミコナダニ属ダニは多回交尾をすることが知られている。本実験ではストックカルチャー中より交尾中でない雄または雌を無作為に選抜した。従って、ミニシャーレ内でペアを組む雌雄はいずれも交尾経験済みのダニと思われる。また、観察時間は85%以上の雌雄間で交尾姿勢が成立する14分間とした。

雄を条件付けした後、そこに雌を導入した場合と雄を導入した場合で、観察時間内にタッピング行動が観察された例数と観察されなかった例数を比較した（反応/非反応試験）。反応/非反応試験での有意差の検定は、 $\chi^2$  独立性の検定法により行った。また、タッピング行動が観察された場合には、行動が認められた時間の分布を上述の2実験間で比較した（時間分布試験）。その有意差検定は、ノンパラメトリックな独立2群間の検定に用いられる Mann-Whitney *U* test (Stat View II) 法により行った。

1975年に無気門亜目コナダニ科に属するケナガコナダニ *Tyrophagus putrescentiae* に警報フェロモンとして *neryl formate* が同定されて以来 (Kuwahara et al., 1975), 警報・集合・性フェロモン等様々な情報化学物質がコナダニ科に属する多くのダニから単離・同定されてきた (桑原保正, 1990; Kuwahara, 1991). 著者はこの中でも特に性フェロモンに着目した. 著者がこの研究を始める以前に, コナダニ科ダニの性フェロモンについての研究は, 行動観察から性フェロモンの存在を示唆する報告 (Levinson et al., 1989) と, 実際に雄ダニを性的に興奮させる雌の性フェロモンを同定した3例 (Leal et al., 1989a; Kuwahara et al., 1992; Sato et al., 1993) の報告があった. Levinson らはアシブトコナダニ *Acarus siro* の行動観察から, 雌は雄の性フェロモンを検知して雄に接近し, 続いて雄が雌の生産する性フェロモンで興奮し交尾行動を取ると報告している. しかし, アシブトコナダニのそれらフェロモンは現在まだ同定されていない. Leal らは本研究でも用いた *Caloglyphus polyphyllae* を使って, 雄を性的に興奮させる化合物  $\beta$ -acaridial を雌の性フェロモンと同定した. 濾紙に試料を塗布してダニに与える生物試験で, 行動の変化を定性的に評価して, 活性を判断している. その際に,  $\beta$ -acaridial が雄ダニに対し誘引活性を示すこと, 及び雄ダニのマウント行動を活発化することを認めている. Kuwahara らはムギコナダニ *Aleuroglyphus ovatus* を用いて雄ダニ同士のマウント行動を定性的に評価することから, 雌の性フェロモンとして 2-hydroxy-6-methylbenzaldehyde を同定した. 更に, ムギコナダニにおいて雌の性フェロモンの分布を雌・雄・若虫で比較したところ, 雌の性フェロモンは若虫には殆ど検出されないものの, 雄ダニにも雌ダニと同じ程度の雌の性フェロモンを検出できたと報告している. また, Sato らはアシブトコナダニの近縁種であるオソアシブトコナダニ *Acarus immobilis* を用いて, 性フェロモンの研究を行った. 生物試験容器内の80%以上の雄ダニにマウント行動が認められた場合に活性有りと評

価する方法で、2-hydroxy-6-methylbenzaldehyde を雌性フェロモンとして 同定した。雌の性フェロモンの分布は、雄：雌：若虫 = 1.3：1：0.08 と報告されており、量的には少ないものの若虫にも主要成分として 2-hydroxy-6-methylbenzaldehyde が検出されている。また、オソアシブトコナダニでは更に、雌誘引性を持つ雄の性フェロモンの存在も示唆されており、活性成分の一部として tridecane, pentadecane, heptadecane, (Z)-8-heptadecane, (Z, Z)-6, 9-heptadecadiene, pentacosane, heptacosane 及び nonacosane が同定されている。これは部分的ではあるものの、コナダニ科で雌誘引性の雄の性フェロモンが同定された最初の例である。以上が、著者の研究以前に行われたコナダニ科ダニの性フェロモンについての研究の概要である。

以上の報告から考えて、著者はゴミコナダニ属ダニ (*Caloglyphus* spp.) の性フェロモンに関する研究を始めるに当たって、“雄ダニを誘引しマウント行動を解発する雌の性フェロモンが、雌雄ともに、あるいは若虫にも存在する場合、その化合物をフェロモンと考えられるのか”という点に留意した。一般に性フェロモンは交尾行動の際の雌雄の認識に働くと考えられている。しかし、雄ダニを誘引しマウント行動を解発する雌の性フェロモンが雌雄共に認められるコナダニ科の場合、マウントの対象として雌雄の識別が成されているのだろうか。この問題を解決するために、本研究はゴミコナダニ属コナダニ (*Caloglyphus* spp.) 4 種を用いて、(1) それらの配偶行動の検討、(2) 雌の性フェロモンの同定、(3) 雌の性フェロモンの分布様式の検討及び(4) 雄ダニによる雌雄識別の検討を行った。

Levinson らの報告によると、アシブトコナダニでは先ず雌が雄の存在に気付いて、雌ダニの方から雄ダニに接近する。続いて、雌ダニの後胴体部が雄ダニに近づくとき雌性フェロモンにより雄ダニが雌ダニにマウントする。この後にも 2 章で述べたように一連の行動が続くが、配偶行動の初期段階で積極的に異性に接近するのは雌ダニであると報告している。このアシブトコナダニの配偶行動のシーケンスがゴミコナダニ属ダニにも当てはまるかどうか

かを検証するため、ゴミコナダニ属 4 種の配偶行動を合計 300 例観察した。予備試験から本論文では 4 種の配偶行動に質的な差異は無いと考え、そのうちの *C. rodriguezi* についての合計 120 例を検討した。その結果、*C. rodriguezi* の配偶行動は 4 段階に大きく分類することができた。そして、配偶行動の初期に雌雄のどちらが積極的かを検討すると、雄ダニから雌ダニへ接触した例が有意に多く認められ、雌ダニから接触した場合には雄ダニは逃げてしまう為、交尾姿勢が成立する割合も極端に低かった。厳密に考えれば、このデータだけでは雌雄のどちら側が異性に最初に接近したかを評価することはできないが、配偶行動の観察から得られた定性的な評価と併せて、配偶行動の初期段階では雄ダニがより積極的に働きかけると結論した。従って、アシプトコナダニとは異なり、ゴミコナダニ属ダニでは雄は雌に誘引され、続いてマウントすると考えた。これはマダニ科ダニで一般に知られている配偶行動シーケンスと同じである (Sonenshine et al., 1991)。

また、雌雄のダニの接触に続いて雄は雌にマウントするが、この時雄ダニは特徴的な動きを示した。雄ダニは両第 1 脚で雌ダニの体表を交互にトントンと叩くように雌に触る (タッピング行動) が、この第 1 脚の上げ方は通常よりも高く、マウント行動に特徴的と考えた。この様な第 1 脚の動きはカブリダニの一種 *Phytoseiulus persimilis* の揮発性カイロモンに対しても報告されており、第 1 脚の末節に嗅覚性の化学受容器があると結論されている (Dicke et al., 1991)。カブリダニとゴミコナダニでは前者が中気門垂目で後者が無気門垂目であり、分類学的にも大きな違いがある上に、化学物質もカイロモンとフェロモンという差もあり、この事実だけからゴミコナダニ属ダニの場合も、フェロモンの嗅覚性化学受容器が第 1 脚に存在すると考えるのは早計ではあろう。しかし、配偶行動の初期段階に特徴的なこの第 1 脚の動きを見ると、その仮説は検討に検討に値するものと思われる。一方、Leal らは本実験でも用いた *C. polyphyllae* を使って、化学受容に関する研究を行っている (Leal et al., 1989a; Leal and Mochizuki, 1990)。それによると、*C. polyphyllae* の前体部背面にある外前体部毛が雌性フェロモンの受容器官で

あるとしている。これは外前体部毛を抜き取った雄ダニが、雌性フェロモンに反応しなくなったことから結論している。著者は Leal らの実験の追試を試みたが、生きている雄ダニから外前体部毛を抜き取ることができなかった。コナダニ科のダニにおける化学受容の研究は今後の大きな課題であろう。

雄ダニの誘引とマウント行動を引き起こすフェロモンについて検討した。*C. polyphyllae* では雌性フェロモンである  $\beta$ -acaridial は雄ダニの誘引活性と共にマウント行動をも解発すると報告されている (Leal et al., 1989a)。一方、ムギコナダニやオソアシブトコナダニでは雄ダニにマウント行動を解発することを認めているが、誘引活性については述べられていない (Kuwahara et al., 1992; Sato et al., 1993)。

序論で触れたように、マダニ科の性フェロモン研究によると雄を誘引するフェロモンとマウント行動を解発するフェロモンは別々の化合物であり、更に生殖腺性フェロモンの存在も知られている (Sonenshine et al., 1991)。ここで比較のために、簡単にマダニ科の性フェロモンについてまとめたい。ダニ目のマダニ科で最初に雄誘引性フェロモン 2,6-dichlorophenol が同定されたキララマダニ属の一種 *Amblyomma americanum* では、雌ダニ一頭当たり 5 ng に対して雄ダニでは痕跡しか検出されなかった (Berger, 1972)。その後、コイタダニ属の一種 *Rhipicephalus sanguineus* (Chow et al., 1975)、カクマダニ属 *Dermacentor andersoni*, *D. variabilis* (Sonenshine et al., 1976)、イボマダニ属の *Hyalomma dromedarii*, *H. anatolicum excavatum* (Silverstein et al., 1983)、チマダニ属の一種 *Haemaphysalis leporispalustris* (Berger, 1983) など 5 属 14 種のマダニ科の雌に雄誘引性フェロモン 2,6-dichlorophenol が同定されている (Hamilton et al., 1989)。なお、このフェロモンは foveal 腺で生合成される (Sonenshine et al., 1977)。このように、マダニ科の雌の雄誘引性フェロモンは非種特異的である点に特徴がある。それでは、異種の雌雄間でも交尾行動が認められるのだろうか。実験によると、誘引された雄ダニは

雌ダニに接触する。同種の雌の時には雄ダニは雌ダニにマウントするが、異種の雌ダニの場合には雄はマウント行動を中断するという (Rechav et al., 1982)。Hamilton らは上述したカクマダニ属の一種 *D. variabilis* から同種の雌を認識するための接触性の性フェロモン (マウント性フェロモン) を cholesteryl oleate と同定し、他のマダニ科ダニにも同様な性フェロモンがあると推察している (1989)。更に *D. andersoni* と *D. variabilis* の間では種の認識のために三番目の性フェロモンが必要とされ、生殖腺性フェロモンとして 20-OH-ecdysone (Sonenshine et al., 1985) と C14 から C22 までの飽和脂肪酸 (Allan et al., 1989) が活性成分の一部として同定されている。

このようなマダニ科ダニの性フェロモン機構との比較のために、コフキコガネ由来の *Caloglyphus* sp. 1 及びナガチャコガネ由来の *Caloglyphus* sp. 2 の未同定種 2 種と *Caloglyphus rodriguezi* の雌の性フェロモンの同定の過程で、誘引活性とマウント行動の解発の両方の活性について検討した。結論から述べると、これらの 3 種で同定した雌性フェロモンはいずれも雄ダニ誘引活性とマウント行動解発の二つの機能を有していた。これはマダニ科ダニの性フェロモン機構と大きく異なる点である。更に、複数の雄ダニを隔離して一晩放置すると、雄ダニ同士で交尾姿勢を成立させているペアや何頭もの雄ダニが重なり合って交尾姿勢を成立させている例が観察される。これは雄ダニ同士でも最終的な交尾体制を成立できることを意味しており、マダニ科ダニで報告されているようなマウント性フェロモンや生殖腺性フェロモンがゴミコナダニ属ダニにも存在するとは考えにくい結果を得た。ゴミコナダニ属ダニのマウント性フェロモンや生殖腺性フェロモンについては更なる研究が必要と思われる。従って、現段階でマダニ科ダニとゴミコナダニ属ダニとの性フェロモン機構を比較すると、ゴミコナダニ属ダニの雌性フェロモンは種特異的で、かつ雄ダニ誘引活性とマウント行動解発の二つの機能を持つ点に特徴があると結論できる。

また、従来の研究では定性的に活性を評価していたので、本研究では活性を定量的な評価で表すように生物試験を工夫した。マウント行動の解発に対

する活性の定量化については、一定時間当たりに観察されるマウント回数を指標に用いて成功したが、誘引活性の定量化は十分に行えなかった。そこで、雄ダニが両方の第1脚を大きく上げてサンプルを塗布した濾紙を交互にトントンと叩くように触る特徴的な行動（タッピング行動）を指標として、誘引活性を評価することにした。誘引活性の定量化が困難であったのは、Leal らが指摘するように（Leal et al., 1989a）昆虫に知られている性フェロモンの誘引活性に比較して、ゴミコナダニ属ダニの雌性フェロモンの持つ誘引活性が、そもそも弱いことに起因するのではないかと考えている。確かに昆虫と比較すると運動能力ではるかに劣り、恐らく密集して生活していると思われるゴミコナダニ属ダニでは、強い誘引活性を持つフェロモンは必要ないのかも知れない。また、マダニ科イボマダニ属 *Hyalomma drommedarii* でも雄誘引性フェロモン 2, 6-dichlorophenol の誘引活性も弱く、8 cm 離れると効力は無くなると報告されている（Khalil et al., 1981）。

今回雌の性フェロモンを新たに同定した3種と雌の性フェロモンが既知である *C. polyphyllae* を加えた計4種のゴミコナダニ属ダニで、雌の性フェロモンの分布様式を検討した。この研究では、成虫における雌の性フェロモンの定量は一頭ずつ行うことと、若虫での検討は第一若虫で行うことに留意した。その理由を以下に示す。一頭ずつの定量は個体間におけるフェロモン含量のバラツキを明確にし、後に述べるように雌雄一頭ずつで行った雄ダニによる雌雄識別の実験結果と、関連させることができる。また、一般にコナダニ科では発育期に卵・幼虫・前若虫（第一若虫）・後若虫（第三若虫）・成虫が認められるが、ムギコナダニやオソアシブトコナダニでは若虫成分を一括して報告している。そこで、本研究では第一若虫のみを用いてその体表成分を分析した。その結果、研究に用いたゴミコナダニ属ダニ4種の雌の性フェロモンはいずれも雌雄共に主要体表成分として検出されたが、雌の性フェロモンが成虫と同様に第一若虫にも存在するグループ (*Caloglyphus* sp. 1, *C. polyphyllae*) と成虫特異的であるグループ (*C. rodriguezi*, *Caloglyphus* sp. 2)



の二群に分類できた。また、雌雄間でフェロモン含量を比べたところ、4種ではいずれも雌ダニの方が有意に多くのフェロモンを持っていた。更に、フェロモン含有量を雌/雄の比率で調べたところ、*Caloglyphus* sp. 1 (1.4/1), *C. polyphyllae* (3.4/1), *C. rodriguezi* (6.3/1), *Caloglyphus* sp. 2 (8.4/1) となった。上述のようにグループ分けした結果と雌雄間におけるフェロモン含有比率を考え合わせると、雌雄間でフェロモンの比率が雌に偏っている2種で、フェロモンが成虫特異的に分布しているという興味深い結果を得た。今回新たに同定した雌の性フェロモン3種を加え、コナダニ科3属6種の雌の性フェロモンは、いずれも雌雄共に主要成分として存在することが明らかになった。そこで、次にこの様な例が他の動物にも認められるのかを調べた。

Stowe によれば、雌をまねることで雄の交尾行動に何らかの利点がある場合には、多くの動物で雄が雌をまねることが観察されている (1988)。例えば、ある種のヘビ *Thamnophis sirtalis parietalis* では雄が雌のフェロモンを生産し、実際にこの雄の溶媒抽出物は雌の溶媒抽出物と同じように雄に興奮を引き起こす。この場合の雄の受ける利点についての議論は他にゆずるが (Marson, R. T. and D. Crews, 1985), 雄に偏った“交尾球”の厳しい競争の中で、雄は他の雄を混乱させながら自分だけはこっそりと本当の雌と交尾する。

一方、多くの昆虫においても、他の雄により雄が配偶行動を解発されたり、時には遠距離誘引されたりする場合もある。例えば、キイロショウジョウバエ *Drosophila melanogaster* (Diptera: Drosophilidae) では、非常に若い雄に認められる揮発性物質が雄同士の交尾行動を引き起こす。一方、野生株の成熟した雄の抽出物には、この様な活性は認められない。この若雄に認められる揮発成分が、雌の持つフェロモンと同じ化合物である、と結論されてはいないが、ガスクロマトグラフによる分析では活性成分の保持時間はほぼ等しい (Tompkins et al., 1980)。ナカアカヒゲブトハネカクシ *Aleochara curtura* (Coleoptera: Staphylinidae) では、雄に性欲を促す雌の性フェロモンとして (Z)-9-henicosene, (Z)-7-henicosene, (Z)-9-tricosene 及び (Z)-7-

tricosene が同定されている。これらのフェロモンは雌や羽化直後の若雄には認められるものの、成熟した雄には殆ど検出されない。この虫の場合は、若雄が雌の性フェロモンを持つことで、雌の振りをして、他の雄による攻撃から身を守るといふ、適応的な意味があるのではないかと考えられている (Peschke, 1985)。Peschke の研究では若雄が雌の性フェロモンを持つ意味を、同性内の競争の観点で論議している点が大変興味深い。また、ある種のミツバチモドキ *Colletes cunicularius* (Hymenoptera: Colletidae) では雄が雌に先立って羽化し、羽化した雄は羽化直前の雌を地表から掘り出すことが知られている。地表に埋もれている羽化前の雌の存在を雄に認識させ、これを掘り出す行動を解発するフェロモンは、大顎腺から分泌される linalol と同定されている。しかし、この場合も linalol は羽化前の雌雄の両方に検出されている。実際に、野外の観察でもたびたび雄により羽化前の雄が掘り出され、時には雄同士のひっかかり合いで雄が傷つく場合もある (Cane and Tengo, 1981)。この虫は雄も雌も linalol を防御物質として持つことで利益を受けており、更にこの化合物が性フェロモンの進化的な起源になったのではないかと、Cane らは推測している。以上はいずれも若い雄が雌の性フェロモンを有している例である。

これらに対して、チャイロコメノゴミムシダマシ *Tenebrio molitor* (Coleoptera: Tenebrionidae) では化学構造は未定ながら、成熟した雄の抽出物も雌の抽出物と同じように雄のマウント行動を引き起こすが、若雄の抽出物にはフェロモン活性は認められなかった (Tschinkel et al., 1967)。また、平均フェロモン含量の比 (雌/雄) は 5.6/1 であった。配偶行動の観察においても、雄は未成熟の若雄や若雌にはマウント行動を示さないが、成熟した雄には頻繁にマウント行動を試みる。これらの観察事実から、チャイロコメノゴミムシダマシの性フェロモンは弱い誘引活性を持ち、その主要な役割は雄を性的に興奮させ、雌として雄に認識させることにあるのではないかと Tschinkel らは推論している。しかしながら、成熟した雄が雌の性フェロモンを持つ意味については議論されていない。

ハイイロゴキブリ *Nauphoeta cineria* (Dictyoptera: Oxyhaloinae) の雄の翅上げ行動は、雌の体表を覆う飽和炭化水素群によって解発される。同じ炭化水素群が雄にも含まれているのにも関わらず、雄が雄に対して翅上げ行動を起こさないのは、雄の表皮ワックスに翅上げ行動を抑制する物質が含まれているからである。この活性物質は *nauphoetin* と名付けられ、octadecyl (Z)-9-tetracosenoate と同定された (Fukui and Takahashi, 1983)。また、マツノマダラカミキリ *Monochamus alternatus* (Coleoptera: Cerambycidae) とスギカミキリ *Semanotus japonicus* (Coleoptera: Cerambycidae) においては、雄のマウント行動を解発する接触性フェロモンの存在が示唆されており、いずれのカミキリムシでもフェロモンは雌雄共に検出されている (Kim et al., 1992; Kim et al., 1993)。更に、スギカミキリ雄の体表には、接触性フェロモンの作用を抑える炭素数 31 以上の炭化水素群の存在も併せて報告されている。

マダニ科ダニの中にも雄誘引性フェロモンが、雌雄共に認められた例がある。キララマダニ属の一種 *A. maculatum* では雌雄共に雄誘引性のフェロモンである 2, 6-dichlorophenol がほぼ同程度、一頭当たり数十 ng 検出されている (Kellum and Berger, 1977)。同フェロモンが雌の行動に対して集合等の何らかの活性を示すのではないかと検討されたが、特に顕著な行動は認められていない。また、カクマダニ属 *D. variabilis* の吸血雄にも同フェロモンが検出されているが、フェロモンの雌ダニに対する活性については言及されていない (Sonenshine et al., 1984)。

以上、本実験で用いたゴミコナダニ属ダニ 4 種を含めたコナダニ科 3 属 6 種で認められたように、性行動のあるステップを制御する性フェロモンが雌雄ともに検出される例を幾つか挙げた。キイロシヨイウジョウバエ、ナカアカヒゲブトハネカクシ、ミツバチモドキでは若雄でフェロモンが認められるのが、成熟するにつれてフェロモンは消失する。ハイイロゴキブリの雄は成熟するにつれて雌の性フェロモンが消失するわけではないが、その作用を抑制する *nauphoetin* が分泌される。成熟したスギカミキリ雄にも接触性フェロモンの作用を抑制する物質の存在が示唆されている。従って、これらの昆

虫ではいずれも成熟した雌雄間では、明確な識別が成されていると考えられる。これに対して、チャイロコメノゴミムシダマシでは雌の性フェロモンが成熟した雄にも認められている。Tschinkel らの研究では雌雄におけるフェロモン含量の差異が、雄に雌雄の識別を可能にしている、という考えが示唆されているものの、実験による実証はされていない。雄ダニがフェロモンを持つ一部のマダニ科ダニに至っては、雄ダニによる雌雄の識別は何ら考察されていない。

ゴミコナダニ属ダニにおいては、雌雄間のヘキササン抽出物のガスクロマトグラムに質的な違いは認められなかった。また、*Caloglyphus* sp. 1 で調べたように、雄ダニは雌ダニの抽出物に示した活性とほぼ同じ活性を雄ダニ抽出物にも示した。従って、ゴミコナダニ属ダニの雄では雌の性フェロモンが成熟に従って消失することなく、その作用を打ち消す物質を分泌することもないと考えられる。しかしながら、雌の性フェロモンの量的な違いは研究に用いた4種いずれにも認められ、雌の方が有意に多くのフェロモンを持っていた。すなわち、フェロモンの分布の仕方はチャイロコメノゴミムシダマシと同じこととなる。ゴミコナダニ属ダニでも Tschinkel らが推察したように、雌雄におけるフェロモン含量の差異が雄に雌雄の識別を可能にしているならば、その仮説の検証に本研究で用いた4種のダニは非常に良いモデルになりうると考えた。この仮説が正しければ、雌雄間のフェロモンの含有量の差が小さい *Caloglyphus* sp. 1 と、その含有量の差が大きい *Caloglyphus* sp. 2 とでは、雄ダニによる雌雄の識別に何らかの違いが生ずると思われた。そこで、ゴミコナダニ属4種を用いて雄ダニによる雌雄の識別実験を行った。

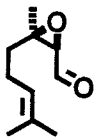
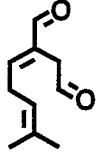

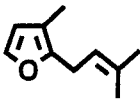
配偶行動の観察から、その初期の段階に積極的な動きを示すのは雄ダニの方であると結論できた。そこで、雄ダニを条件付けした後雌ダニまたは雄ダニを導入し、条件付け個体と導入個体の間で一定時間内にタッピング行動が観察される例と観察されない例を数えた（反応/非反応試験）。また、タッピング行動が観察された場合はその時間を記録し、タッピング行動が観察さ

れるまでの時間の分布に雌雄のダニの導入間で差があるか否かについても検討した（時間分布試験）。その結果，雌の性フェロモンの含有量比（雌/雄）が4種の中で最も小さい *Caloglyphus* sp. 1 (1.4/1) では反応/非反応試験でも時間分布試験でも，条件付け雄ダニに雌ダニを導入した場合と雄ダニを導入した場合とで，有意差は認められなかった。一方，その他の *C. polyphyllae* (3.4/1), *C. rodriguezi* (6.3/1), *Caloglyphus* sp. 2 (8.4/1) では，いずれの試験においても有意差が認められた。以上，予想された通り，*Caloglyphus* sp. 1 では雄ダニによる雌雄識別が成されていないのに対して *Caloglyphus* sp. 2 では雄ダニは雌雄を識別していると結論できた。また，同時に *C. polyphyllae* (3.4/1), *C. rodriguezi* の雄ダニも雌雄を識別していると考えた。

本研究によりゴミコナダニ属4種の性フェロモン機構は表5-1のようにまとめることができる。先ず有機化学的な観点から，ゴミコナダニ属3種から雌の性フェロモンとして新規化合物である (2*R*, 3*R*)-epoxyneral を含め rosefuran や undecane を同定した。Leal らが同定した *C. polyphyllae* の新規化合物の雌の性フェロモン  $\beta$ -acaridial を含めると，ゴミコナダニ属4種から2つの新規化合物が同定されたことになり，ゴミコナダニ属ダニが有機化学的な資源として興味ある対象であることが示唆される。更に本研究における主要課題であった“雄ダニを誘引し，交尾行動を解発する雌の性フェロモンが雌雄ともに，あるいは若虫にも存在する場合，その化合物をフェロモンと考えられるのか”という点については，*Caloglyphus* sp. 1 のように雌雄の識別が成されていないと考えられる例も認められたが，その他の3種のようにフェロモンの比率が雌に偏るに従って雌雄の識別が可能となることを見出した。従って，ゴミコナダニ属4種の雌の性フェロモン機構は一般の昆虫に比べると不完全なものながら，化学物質が性フェロモンとして進化してきた原型に近いシステムにあるのではないかと推論した。また，その不完全なシステムの中にも，フェロモン含有量に関連した雌雄の識別と，フェロモンの

分布に連続性が認められたことは、ゴミコナダニ属ダニの雌の性フェロモン機構を考える上で興味深いものとなる。 *Caloglyphus* sp. 1 よりも更に雌雄の分化が成されていない，例えばフェロモン含有量に雌雄間で差が認められないゴミコナダニ属ダニはいないだろうか。 反対に， *Caloglyphus* sp. 2 よりも更に雌雄の分化が進んだ，雄に全く雌性フェロモンが認められないゴミコナダニ属ダニはいないだろうか。 また，発想を変えて本実験で用いたゴミコナダニ属 4 種の間に遺伝子レベルで認められる連続性は無いだろうか。 今後この様な連続性を視野に入れ，生理・生化学的な見知も含めたダニにおける化学生態学の研究を進めると，昆虫とはまた別の世界が広がっていくのではないだろうか。

表 5-1 ゴミコナダニ属 4 種の性フェロモン機構

<i>Caloglyphus</i> sp. 1	<i>C. polyphyllae</i>	<i>C. rodriguezi</i>	<i>Caloglyphus</i> sp. 2
 (2 <i>R</i> ,3 <i>R</i> )-Epoxyneral	 $\beta$ -Acaridial	 Undecane	 Rosefuran
<ul style="list-style-type: none"> <li>・雌雄成虫に主要成分として存在</li> <li>・若虫に主要成分として存在</li> <li>・雌：雄=1.4：1</li> <li>・導入テストで雌雄の区別無し</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>・雌雄成虫に主要成分として存在</li> <li>・若虫に主要成分として存在</li> <li>・雌：雄=3.4：1</li> <li>・導入テストで雌雄の区別有り</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>・雌雄成虫に主要成分として存在</li> <li>・若虫に微量成分として存在</li> <li>・雌：雄=6.3：1</li> <li>・導入テストで雌雄の区別有り</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>・雌雄成虫に主要成分として存在</li> <li>・若虫に微量成分として存在</li> <li>・雌：雄=8.4：1</li> <li>・導入テストで雌雄の区別有り</li> </ul>

## 摘 要

- (1) 無気門亜目ネダニ亜科に属するゴミコナダニ属 4 種で配偶行動を観察し、配偶行動のシーケンスを明らかにした。また、ダニのヘキサン抽出物が雄ダニの誘引活性と雄ダニにマウント行動を解発すること認めた。活性物質の精製・単離と生物試験の結果、二つの活性は同一の化合物によることを明らかにし、これを雌の性フェロモンとした。
- (2) コフキコガネより得たゴミコナダニ属未同定種 *Caloglyphus* sp. 1 の雌の性フェロモンを新規化合物の (2*R*, 3*R*)-epoxyneral と同定した。また、その鏡像体である (2*S*, 3*S*)-体は天然物の活性発現を阻害しなかった。
- (3) *C. rodriguezi* の雌の性フェロモンを undecane と同定した。Undecane の高濃度処理では雌、雄及び若虫に忌避行動を解発されたが、一頭当たりの含量から undecane が警報フェロモンとしても機能しているとは現在のところ考えていない。
- (4) ナガチャコガネより得たゴミコナダニ未同定種 *Caloglyphus* sp. 2 の雌の性フェロモンを rosefuran と同定した。
- (5) 本研究で雌の性フェロモンが明らかになった 3 種と、フェロモンが既知であるゴミコナダニを加えた合計 4 種で、雌性フェロモンの分布を検討した。その結果、雌雄間でフェロモン含有量に差がある種ほど、フェロモンは成虫特異的に存在し、フェロモンの分布に連続性が認められた。
- (6) これらゴミコナダニ属 4 種で雄ダニによる雌雄の区別について検討し

た。その結果、雌雄間のフェロモン含有量の差が小さい種 *Caloglyphus* sp. 1 では雌雄の識別は成されていなかったが、雌雄の識別が成されているその他3種ではフェロモン含有量の差がいずれも *Caloglyphus* sp. 1 よりも大きかった。従って、雌雄間の雌の性フェロモン含有量の差が雌雄の識別に寄与すると示唆された。



## 謝 辞

本研究を行う機会を与えて下さり、研究遂行にあたっては終始御指導と激励を賜りました京都大学農学部農薬研究施設、桑原保正教授に篤く御礼申し上げます。また、数々の御援助頂きました高橋正三教授、津田盛也教授に深く感謝致します。

貴重な御助言・御鞭撻を頂きました農薬研究施設の西田律夫博士、福井昌夫博士、佐久間正幸博士、高林純示博士、田中千尋博士並びに京都大学農学部農芸化学科宮川恒博士に心から御礼申し上げます。また、研究に使用した生物試料を提供し、多くの御助言を賜りました黒佐和義博士に喪心より深謝致します。更に、幾多の御助力頂いた同研究施設の諸兄諸氏に感謝の意を表します。

最後に、これまでにあたたかい激励を賜りました京都大学名誉教授深海浩先生、京都大学農学部農芸化学科上野民夫教授、阪南大学鶴嶋鉄博士、高知大学農学部農芸化学科金哲史博士に心から感謝致します。

## 引用文献

- Allan, S. A., J. S. Phillips, D. Taylor and D. E. Sonensine (1989) Genital sex pheromone of ixodid ticks: Evidence for the role of fatty acids from the anterior reproductive tract in the mating of *Dermacentor variabilis* and *Dermacentor andersoni*. *J. Insect Physiol.* 34, 315-323.
- Ayorinde, F. O., J. W. Wheeler and R. M. Duffield (1984) Synthesis of dehydrocineole, a new monoterpene from the acarid mite, *Caloglyphus rodriguezi* (Arachnida: Acari). *Tetrahedron Lett.* 25, 3525-3528.
- Berger, R. S. (1972) 2, 6-Dichlorophenol, sex pheromone of the lone star tick. *Science* 177, 704-705.
- Berger, R. S. (1983) Occurrence of 2, 6-dichlorophenol in *Dermacentor albipictus* and *Haemaphysalis leporispalustris* (Acari: Ixodidae). *J. Med. Entomol.* 20, 103-104.
- Blum, M. S. (1981) Behavioral responses of Hymenoptera to pheromones and allomones. In: *Chemical control of insect behavior* (H. H. Shorey, J. J. Mckelvey, Jr. ed.), John Willey & Sons, New York, 149-167.
- Boczek, J. and Griffiths D. A. (1979) Spermatophore production and mating behaviour in the stored product mites *Acarus siro* and *Lardoglyphus konoi*. In: *Recent advances in acarology* (J. G. Rodriguzi ed.), Vol. 1, Academic Press. New York, 279-284.
- Brich, A. J. and J. Slobbe (1976) Oxidative decarboxylation of dihydroaromatic acids with lead tetraacetate: A synthesis of olivetol dimethyl ether and of rosefuran. *Tetrahedron Lett.* 24, 2079-2082.
- Broussut, R., P. Dubois et J. Rigaud (1974) Le gregarisme chez *Blaberus carniifer* isolement et identification de la pheromone. *J. Insect Physiol.* 20, 529-543.
- Buchi, G., E. sz. Kovats, P. Enggist and G. Uhde (1968) Syntheses of rose-

- furan and dehydroelsholtzine. *J. Org. Chem.* 33, 1227-1229.
- Cane, J. H. and J. O. Tengo (1891) Pheromonal cues direct mate-seeking behavior of male *Colletes cunicularius* (Hymenoptera: Colletidae). *J. Chem. Ecol.* 7, 427-436.
- Chow, Y. S., C. B. Wang and L. C. Lin (1975) Identification of a sex pheromone of the female brown dog tick, *Rhipicephalus sanguineus*. *Ann. Entomol. Soc. Am.* 68, 485-488.
- Corey, E. J. and G. Schmidt (1979) Useful procedures for the oxidation of alcohols involving pyridinium dichromate in aprotic media. *Tetrahedron Lett.* 399-402.
- Dicke, M., M. W. Sabelis, R. J. F. Bogaers, M. P. T. Alers & I. van Halder (1991) Kairomone perception by a Predatory mite: Behavioural analysis of chemoreceptor-carrying extraemities. *Proc. Exper. & Appl. Entomol., N. E. V. Amsterdam* 2, 179-184.
- Dicke, M., M. W. Sabelis, J. Takabayashi, J. Bruin and M. A. Posthumus (1990) Plant strategies of manipulating predator-prey interactions through allelochemicals: Prospects for application in the pest control. *J. Chem. Ecol.* 16, 3091-3118.
- Eagan, M. E. (1976) The chemosensory bases of host discrimination in the parasitic mite. *J. Comp. Physiol.* 109, 69-89.
- Eraky, S. A. (1987) Observations on biology of two species of acarid mites. *Folia Entomol. Hung.* 48, 21-27.
- Fukui, M. and S. Takahashi (1983) Studies on the mating behavior of the cockroach, *Nauphoeta cinerea* (Oliver) (Dictyoptera: Blaberidae). III. Isolation and identification of intermale recognition pheromone. *App. Ent. Zool.* 18, 351-356.
- Gedge, D. R. and G. Pattenden (1977) Prenylation of but-2-enolides: Syntheses of rosefuran and related natural furans. *Tetrahedron Lett.* 50, 4443-4446.

- George, J. E. (1981) The influence of aggregation pheromones on the behavior of *Argas cooleyi* and *Ornithodoros concanensis* (Acari: Ixodidae: Argasidae). *J. Med. Entomol.* 18, 129-133.
- Hajkova, Z. and M. G. Leahy (1982) Pheromone-regulated aggregation in larvae, nymphs and adults of *Ixodes ricinus* (L.) (Acarina: Ixodidae). *Folia Parasitol. (Praha)* 29, 61-67.
- Hamilton, J. B. C., D. E. Sonenshine and W. R. Lusby (1989) Cholesteryl oleate: Mounting sex pheromone of the hard tick *Dermacentor variabilis* (Say) (Acari: Ixodidae). *J. Insect Physiol.* 35, 873-879.
- Houck, M. A. and B. M. O'Connor (1991) Ecological and evolutionary significance of phoresy in the astigmata. *Ann. Rev. Entomol.* 36, 611-636.
- Ishiwatari, T. (1974) Studies on the scent of stink bugs (Hemiptera: Pentatomidae) I. Alarm pheromone activity. *Appl. Ent. Zool.* 9, 153-158.
- Ishiwatari, T. (1976) Studies on the scent of stink bugs (Hemiptera: Pentatomidae) II. Alarm pheromone activity. *Appl. Ent. Zool.* 11, 38-44.
- Katsuki, T. and K. B. Sharpless (1980) The first practical method for asymmetric Epoxidation. *J. Am. Chem. Soc.* 102, 8974-8976.
- Kellum, D. and R. S. Berger (1977) Relationship of the occurrence and function of 2, 6-dichlorophenol in two species of *Amblyomma* (Acari: Ixodidae). *J. Med. Ent.* 13, 701-705.
- Khali, G. M., S. A. Nada, D. E. Sonenshine (1981) Sex pheromone regulation of mating behavior in the camel tick, *Hyalomma dromedarii*. *J. Parasitol.* 67, 70-76.
- Kim, G.-H., J. Takabayashi, S. Takahashi and K. Tabata (1992) Function of the pheromone in mating behavior of the Japanese pine sawyer beetle, *Monochamus alternatus* Hope. *Appl. Ent. Zool.* 27, 489-497.
- Kim, G.-H., J. Takabayashi, S. Takahashi and K. Tabata (1992) Function of contact pheromone of the cryptomeria bark borer, *Semanotus japonicus*

- Lacordaire. *Appl. Ent. Zool.* 28, 525-535.
- Kuo, J. S. and H. H. J. Nesbitt (1970) The internal morphology and histology of Adult *Caloglyphus mycophagus* (Megnin) (Acarina: Acaridae). *Can. J. Zool.* 48, 505-518.
- 桑原保正 (1990) コナダニ類を有機化学的にみれば-とくに後胴体部腺分泌物と体表成分-. 日本農薬学会誌 15, 613-619.
- Kuwahara, Y. (1991) Pheromone studies on astigmatid mites - alarm, aggregation and sex. In: *Modern Acarology* (F. Dusbabek and V. Buska ed.), Vol. 1, Academia, Prague and SPB Academic Publishing bv, The Hague, 43-52.
- Kuwahara, Y., S. Ishii and H. Fukami (1975) Neryl formate: Alarm pheromone of the cheese mite, *Tyrophagus putrescentiae* (Schrank) (Acarina, Acaridae). *Experientia* 31, 1115-1116.
- Kuwahara, Y., K. Matsumoto and Y. Wada (1980) Pheromone study on acarid mite IV. Citral: composition and function as an alarm pheromone and its secretory gland in four species of acarid mites. *Jap. J. Sanit. Zool.* 31, 73-80.
- Kuwahara, Y., M. Sato, T. Koshii and T. Suzuki (1992) Chemical ecology of astigmatid mites XXXII. 2-Hydroxy-6-methylbenzaldehyde, the sex pheromone of the brown-legged grain mite, *Aleuroglyphus ovatus* (Troupeau) (Acarina: Acaridae). *Appl. Ent. Zool.* 27, 253-260.
- Kuwahara, Y., K. Akimoto, W. S. Leal, H. Nakao and T. Suzuki (1987) Isopiperitenone: a new alarm pheromone of the acarid mite, *Tyrophagus similis* (Acarina, Acaridae). *Agric. Biol. Chem.* 51, 3441-3442.
- Kuwahara, Y., N. Asami, M. Morr, S. Matsuyama and T. Suzuki (1994) Chemical ecology of astigmatid mites XXXVIII. Aggregation pheromone and kairomone activity of lardolure and its analogues against *Lardoglyphus konoï* and *Carpoglyphus lactis*. *Appl. Ent. Zool.* 29, 253-257.

- Kuwahara, Y., W. S. Leal, Y. Nakano, Y. Kaneko, H. Nakano and T. Suzuki (1989) Pheromone study on astigmatid mites XXIII. Identification of the alarm pheromone on the acarid mite, *Tyrophagus neiswanderi* and species specificities of the alarm pheromones among four species of the same genus. *Appl. Ent. Zool.* 24, 424-429.
- Leal, W. S. and Y. Kuwahara (1991) Cuticle wax chemistry of astigmatid mites. In: *Modern Acarology* (F. Dusbabek and V. Buska ed.), Vol. 2, Academia, Prague and SPB Academic Publishing bv, The Hague, 419-423.
- Leal, W. S. and F. Mochizuki (1990) Chemoreception in astigmatid mites. *Naturwissenschaften* 77, 593-594.
- Leal, W. S., Y. Kuwahara, T. Suzuki and K. Kurosa (1989a)  $\beta$ -Acaridial, the sex pheromone of the acarid mite *Caloglyphus polyphyllae*. Pheromone study of acarid mite, XXI. *Naturwissenschaften* 76, 332-333.
- Leal, W. S., Y. Kuwahara, T. Suzuki and H. Nakao (1989b) Chemical taxonomy of economic important *Tyrophagus* mites (Acariformes, Acaridae). *Agric. Biol. Chem.* 53, 3729-3284.
- Leal, W. S., Y. Nakano, Y. Kuwahara, H. Nakao and T. Suzuki (1989c) Identification and synthesis of 2, 3-epoxyneral, a novel monoterpene from the acarid mite, *Tyrophagus perniciosus* (Acarina: Acaridae). *Agric. Biol. Chem.* 53, 295-298.
- Levinson, A. R., H. Z. Levinson and U. Oelker (1989) Two sex pheromones mediated courtship and mating in the flour mite. *Naturwissenschaften* 76, 176-177.
- Lockwood, J. A. and R. N. Story (1985) Bifunctional pheromone in the first instar of the southern green stink bug, *Nezara viridula* (L.) (Hemiptera: Pentatomidae): Its characterization and interaction with other stimuli. *Ann. Entomol. Soc. Am.* 78, 474-479.
- Mason, R. T. and D. Crews (1985) Female mimicry in garter snakes. *Nature*

- Mori, K. (1989) Synthesis of optical active pheromones. *Tetrahedron* 45, 3233-3298.
- 森 謙治 (1994) 生物活性天然物の不斉合成. 化学と生物 32, 126-134.
- Mori, K. and T. Ebata (1986) Syntheses of optical active pheromones with an epoxy ring, (+)-disparlure and both the enantiomers of (3*Z*, 6*Z*)-*cis*-9, 10-epoxy-3, 6-heneicosadiene. *Tetrahedron* 42, 3471-3478.
- Mori, N. and Y. Kuwahara (1995) Synthesis of (2*R*, 3*R*)-epoxyneral, a sex pheromone of the acarid mite, *Caloglyphus* sp. (Astigmata: Acaridae). *Tetrahedron Lett.* 36, 1478-1479.
- 西田律夫 (1985) 昆虫の雄の分泌する性フェロモン. 化学と生物 23, 789-796.
- Peschke, K. (1985) Immature males of *Aleochara curtula* avoid intrsexual aggressions by producing the female sex pheromone. *Naturwissenschaften* 72, 274-275.
- Pillai, P. R. P. and W. Winston (1969) Life history and biology of *Caloglyphus anomulus* Nesbitt (Acarina: Acaridae). *Acarologia* 11, 295-303.
- Potter, D. A., D. L. Wrensch and D. E. Johnston (1976) Guarding, aggressive behavior, and mating success in male twospotted spider mite. *Ann. Entomol. Soc. Am.* 69, 707-711.
- Radwin, J. (1991) Sperm competition in the mite *Caloglyphus berlesei*. *Behav. Ecol. Sociobiol.* 29, 291-296.
- Rechev, Y., R. A. I. Norval, J. H. Oliver Jr. (1982) Interspecific mating of *Amblyomma hebraeum* and *Amblyomma variegatum* (Acari: Ixodidae). *J. Med. Entomol.* 19, 139-142.
- Regev, S. and W. W. Cone (1975) Evidence of farnesol as a male sex attractant of the twospotted spider mite, *Tetranychus urticae* Koch (Acarina: Tetranychidae). *Environ. Entomol.* 4, 307-311.

- Regev, S. and W. W. Cone (1976) Analyses of pharate female the twospotted spider mite for nerolidol and geraniol: Evaluation for the sex attraction of males. *Environ. Entomol.* 5, 133-138.
- Regev, S. and W. W. Cone (1980) The monoterpene citronellol, as a male sex attractant of the the twospotted spider mite, *Tetranychus urticae* (Acarina: Tetranychidae). *Environ. Entomol.* 9, 50-52.
- Royalty, R. N., P. L. Phelan and F. R. Hall (1992) Arrestment of male two-spotted mite caused by female sex pheromone. *J. Chem. Ecol.* 18, 137-153.
- Royalty, R., N., P. L. Phelan and F. R. Hall (1993) Comparative effects of form, colour, and pheromone of twospotted spider mite quiescent deutonymphs on male guarding behaviour. *Physiol. Entomol.* 18, 303-316.
- Samsinak, K. (1980) *Caloglyphus rodriguezi* sp. n., with taxnomic remarks on the tribe caloglyphini (Acari, Acaridae). *Mitt. zool. Mus. Berlin* 56, 201-206.
- Sato, M., Y. Kuwahara, S. Matsuyama, T. Suzuki, M. Okamoyo and K. Matsumoto (1993) Male and female sex pheromone produced by *Acarus immobilis* Griffiths (Acaridae: Acarina). Chemical ecology of astigmatid mites, XXXIV. *Naturwissenschaften* 80, 34-36.
- Silverstein, R. M., J. R. West, D. E. Sonenshine and G. M. Khalil (1983) Occurrence of 2, 6-dichlorophenol in hard ticks, *Hyalomma dromendarii* and *Hyalomma anatolicum excavatum*, and its role in mating. *J. Chem. Ecol.* 9, 1543-1549.
- Sonenshine, D. E. (1985) Pheromone and other semiochemicals of the acari. *Ann. Rev. Entomol.* 30, 1-28.
- Sonenshine, D. E., R. M. Silverstein and J. R. West (1984) Occurrence of sex attractant pheromone, 2, 6-dichlorophenol, in relation to age and feeding in american dog tick, *Dermacentor variabilis* (Say) (Acari: Ixodidae). *J.*



*Chem. Ecol.* 10, 95-100.

Sonenshine, D. E., J. G. Hamilton, J. S. Phillips and W. R. Lusby (1991)

Mounting sex pheromone: Its role in regulation of mate recognition in the Ixodidae. In : *Modern Acarology* (F. Dusbabek and V. Buska ed.), Vol. 1, Academia, Prague and SPB Academic Publishing bv, The Hague, 69-78.

Sonenshine, D. E., R. M. Silverstein, E. Plummer, J. R. West and T.

MaCullough (1976) 2, 6-Dichlorophenol, the sex pheromone of the rocky mountain wood tick, *Dermacentor andersoni* Stiles and the american dog tick, *Dermacentor variabilis* (Say). *J. Chem. Ecol.* 2, 201-209.

Sonenshine, D. E., R. M. Silverstein, L. A. Collins, M. Saunders, C. Flynt and P. J. Homsher (1977) Foetal glands, source of sex pheromone production in the Ixodid tick *Dermacentor andersoni* Stiles. *J. Chem. Ecol.* 3, 695-706.

Sonenshine, D. E., R. M. Silverstein, P. Brossut, E. E. Devis, D. Taylor, K. A. Carson, P. J. Homsher and V. B. Wang (1985) Genital sex pheromone of ixodid ticks: 1. Evidence of occurrence in anterior reproductive tract of american dog tick, *Dermacentor variabilis* (Say) (Acari: Ixodidae). *J. Chem. Ecol.* 11, 1669-1694.

Stowe, M. K. (1988) Chemical mimicry. In: *Chemical mediation of coevolution* (K. C. Spencer ed.), Academic Press, San Diego, 513-580.

Tada, M., K. Chiba and T. Hashizume (1982) Formation of dendrolasin, sesquirosefuran, perillene and rosefuran by biomimetic autooxidation. *Agric. Biol. Chem.* 46, 819-820.

高木正見 (1985) 独立多試料間の多重比較. 植物防疫 39, 39-43.

Takano, S., M. Morimoto, S. Satoh and K. Ogasawara (1984) Syntheses of perillene and rosefuran from common starting materials. *Chem. Lett.* 1261-1262.

Takeda, A., K. Shinhamma and S. Tsuboi (1977) Syntheses with 2-furylmagne-

sium bromides. I. Synthesis of rosefuran and sesquirosefuran.

*Bull. Chem. Soc. Jpn.* 50, 1903-1904.

Tompkins, L., J. C. Hall and L. M. Hall (1980) Courtship-stimulating volatile compounds from normal and mutant *Drosophila*. *J. Insect Physiol.* 26, 689-697.

Tschinkel, W., C. Willson and H. A. Bern (1967) Sex pheromone of the mealworm beetle (*Tenebrio molitor*). *J. Exp. Zool.* 164, 81-86.

Tsunoda, T. (1994) Mating behavior of the predacious mite, *Amblyseius womersleyi* Schicha (Acari: Phytoseiidae). *Appl. Ent. Zool.* 29, 141-147.

Yasui, Y. (1992) The existence of sex pheromone eliciting precapulatory mate guarding behavior in a male predatory mite, *Macrocheles muscaedomesticae* (Scopoli). *J. Ethol.* 10, 15-19.

Walter, F., D. J. F. Fletcher, D. Chautems, D. Cherix, L. Keller, W. Francke, W. Fortelius, R. Rosengren, E. L. Vargo (1993) Identification of the sex pheromone of an ant, *Formica lugubris* (Hymenoptera, Formicidae). *Naturwissenschaften* 80, 30-34.

Woodring, J. P. (1969) Observations on the biology of six species of acarid mites. *Ann. Entomol. Soc. Am.* 62, 102-108.